

# **Caracterização da acumulação de elementos potencialmente tóxicos em alface (*Lactuca sativa* L.)**

INÊS NETO MOREIRA

ORIENTADORES:

Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

Doutora Maria Luísa Louro Martins

Doutor Ernesto José de Melo Pestana Vasconcelos

TESE ELABORADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
ENGENHARIA AGRONÓMICA

2018





## **Caracterização da acumulação de elementos potencialmente tóxicos em alface (*Lactuca sativa* L.)**

INÊS NETO MOREIRA

### **ORIENTADORES:**

Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

Doutora Maria Luísa Louro Martins

Doutor Ernesto José de Melo Pestana Vasconcelos

TESE ELABORADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
ENGENHARIA AGRONÓMICA

### **JÚRI:**

**Presidente:** Doutor Carlos Manuel Antunes Lopes, Professor Associado com Agregação, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.

**Vogais:** Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira, Professora Associada, Universidade de Aveiro;  
Doutora Berta Maria de Carvalho Gonçalves Macedo, Professora Auxiliar, Escola de Ciências da Vida e do Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro;  
Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa;  
Doutora Paula Maria da Luz Figueiredo de Alvarenga, Professora Auxiliar, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa;  
Doutora Olfa Zarrouk, Bolseira de Investigação Pós-doutoral, Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa.

Tese financiada pela Fundação para a Ciência e Tecnologia

Com o apoio da unidade de investigação LEAF - Linking, Landscape, Environmental, Agriculture and Food

2018





## Agradecimentos

Uma tese de Doutoramento é uma vitória pessoal por ser um trabalho que se prolonga no tempo vários anos e que exige uma enorme resiliência, espírito de sacrifício e capacidade de perseverança e, por isso, estou verdadeiramente feliz por ter alcançado esta etapa. É um trabalho muito individual por um lado, mas que sem o envolvimento de várias pessoas não seria possível chegar “até aqui”.

Como deixei para o fim a escrita dos “Agradecimentos”, tenho a perfeita noção que com o cansaço e a distração natural destes últimos dias, que antecederam a entrega de uma tese, me possa esquecer de alguém por lapso! Ainda por cima esta vai ser, sem dúvida (para além dos resumos, objetivos e conclusões), a parte “mais lida” por todas as pessoas que consultarem a minha longa e “interminável” tese.

Queria agradecer sinceramente a todas as pessoas, que diretamente e indiretamente, me apoiaram durante este percurso. Este Doutoramento foi sem dúvida o maior desafio que tive até hoje e com ele compreendi que “tudo se faz” na vida, tudo é possível.

Ao Professor Miguel Mourato e à Professora Luísa Louro agradeço, principalmente, por terem sido sempre muito meus amigos e por ter tido o privilégio de poder trabalhar com duas pessoas de bom coração que vou levar comigo para a vida. Queria também agradecer a orientação científica, a constante transmissão de conhecimentos, pelo *stress oxidativo* que desenvolvi ao longo destes anos (e que faz parte!!), por toda a disponibilidade e pela partilha de bons momentos animados. Vou estar sempre grata por tudo o que fizeram por mim. Muito obrigada.

Ao Professor Ernesto quero agradecer ter aceite esta aventura de ser meu orientador, foi sem dúvida uma mais valia para este trabalho e para mim. Obrigada por todas as sugestões e conhecimentos agronómicos transmitidos, por todas as ajudas no Horto com as “minhas alfaces”, pelo apoio no delineamento e realização dos ensaios em solos, por todas as palavras amigas sempre cheias de sentido de humor e por essa boa disposição que sempre o caracterizam.

Às minhas colegas e amigas do Laboratório 17-A, Joana Sales, Inês Leitão e Filipa Pinto, que me acompanharam ao longo desta viagem agradeço a partilha de momentos, de frascos de vidro “tão desejados”, do espaço no Horto e da “câmara Hotel” para realizar ensaios tão

cobiçada, das micropipetas de 10 mL “invejadas”, entre tantas outras coisas. A todas agradeço a disponibilidade, paciência e presença.

À Filipa agradeço pela partilha de experiências entre “bolseiras” que trocamos ao longo deste percurso chamado Doutoramento. Agradeço “a partilha da tua linda tese” que foi um grande auxílio na realização da minha.

À Inês agradeço os desabafos que trocamos (e que fazem parte!), por toda a ajuda prática que me ofereceu e pela companhia e bons momentos que passamos no congresso de Fisiologia Vegetal em Barcelona!

À Joana agradeço a ajuda que sempre me deu na revisão de documentos, principalmente, na revisão crítica da entrega da tese (obrigada pela grande ajuda que me deste na formatação com esse teu olhar clínico!) e pela constante preocupação nesta fase final.

Quero também agradecer a todos os alunos/colegas que passaram pelo Laboratório 17-A, nacionais e internacionais, pela partilha de conhecimento e por alegrarem os nossos dias.

Quero fazer um agradecimento muito especial ao Felício que foi um apoio fundamental na realização dos ensaios em solos (muito complicados a nível de esforço físico dado o elevado número de vasos envolvidos!!), e que sem ele não seria possível. Queria agradecer toda a ajuda prestada, sempre que precisei ele esteve disponível para me ajudar, pelo sentido de humor e pela entreajuda que acabamos por desenvolver.

Queria agradecer ao Miguel Martins pela forma animada como me recebeu no Laboratório 10 e por toda a ajuda e transmissão de conhecimentos que me deu na realização das análises ao solo. Quero também agradecer ao Hélio Martins por toda a ajuda nesta fase.

À Doutora Luísa Carvalho pela ajuda crucial na determinação da glutatona, após várias tentativas frustradas de atinar com o método. Muito obrigada pela partilha de conhecimentos e pela simpatia.

Quero fazer um agradecimento à Doutora Catarina Pristas e à Doutora Mariana Mota que rapidamente me ajudaram quando a arca -80 °C do nosso departamento se avariou, graças a elas conseguimos “salvar as minhas amostras”. À técnica Ana Carla pela amabilidade na disponibilização temporária de espaço da sua arca -80 °C para guardar as minhas valiosas amostras.

Quero agradecer à Sociedade Hípica Portuguesa e à empresa *ROBCORK* por se terem demonstrado interessados e por terem cedido o estrume de cavalo e o pó de cortiça, respetivamente, que foram importantes na realização deste trabalho.

Por fim (não percebo bem porquê!), agradeço às pessoas mais importantes da minha vida, a minha família querida!

À minha super Mãe pela pessoa importante que é na minha vida. Agradeço todas as palavras de incentivo, todo o apoio, toda a preocupação “natural” de mãe, mas principalmente, por teres estado sempre presente e por sempre queres o meu bem. Obrigada por teres criado todas as condições para que eu pudesse chegar até esta etapa da minha vida académica.

Ao meu maninho João um mega agradecimento por toda a ajuda incansável que me deu durante a realização do Doutoramento. Agradeço-te a companhia nas idas ao fim-de-semana para regar as plantas, as ajudas incansáveis nas colheitas (sem ter nenhuma obrigação, só a pressão natural de uma irmã!) e na contaminação dos solos (longos dias no Horto!). Foi mesmo uma ajuda amiga e muito importante. Obrigada João!

Aos meus avós, que construíram muito da pessoa que sou hoje. Agradeço à “segunda mãe” avó Otília por quem tenho um carinho do tamanho do mundo, de quem me orgulho, que me ensina tanta coisa e que está sempre lá. Ao meu querido avozinho Zé pelo constante sentido de humor que sempre teve e que alegrava todos os meus dias. Sei que gostavas de estar presente para me ver chegar a esta etapa da minha vida.

Ao meu noivinho Pedro, o meu pilar, o meu mais-que-tudo, a minha alegria! Agradeço-te a maneira positiva com que vês a vida e como me ensinas a relativizar os “problemas”. Agradeço-te a fonte inesgotável de boas energias que são essenciais para ultrapassar fases menos boas em geral, e este trabalhão de Doutoramento, em particular. Agradeço-te por muitas vezes seres a melhor parte do meu dia.

Quero agradecer a todos os que tiveram coragem para ler/consultar estas 650 “e tal páginas” até ao fim (ninguém merece!). Mas são fruto de vários anos de grande empenho e trabalho.

A Todos os que se cruzaram na minha vida durante este período e que me deram sempre uma palavra de incentivo!

Muito obrigada!



## Resumo

A contaminação de produtos hortícolas com Elementos Potencialmente Tóxicos (EPTs) é um tema transversal a diferentes áreas científicas, sendo simultaneamente um problema ambiental, agronómico, alimentar e de saúde pública. A alface é uma hortícola muito consumida em Portugal e o seu cultivo em meios contaminados pode sujeitar as plantas a stresses abióticos e à contaminação com EPTs.

O presente trabalho consistiu na caracterização da acumulação de EPTs (Cd, Cr, Pb, Ni, Zn, Cu e Mn) em duas cultivares da variedade *capitata* de alface (*Lactuca sativa* L.), “Batavia Dourada da Primavera” e “Maravilha das Quatro Estações”.

Nos diferentes ensaios realizou-se (i) a avaliação da acumulação e tolerância das plântulas de alface numa fase inicial do desenvolvimento, (ii) uma caracterização da acumulação e avaliação dos indicadores visuais de contaminação da planta, (iii) a identificação das estratégias de defesa induzidas pela acumulação de EPTs, e (iv) a avaliação do efeito da adição de corretivos orgânicos (pó de cortiça e estrume de cavalo) em solos artificialmente contaminados.

Os principais resultados indicam que a **germinação** não é afetada pela presença de EPTs e no **desenvolvimento de plântulas** verificam-se efeitos tóxicos mais precoces para Cd e Cu enquanto o Mn manifesta um menor efeito. A **acumulação** dos EPTs pela planta é descrita por diferentes modelos que diferem para cada metal, cultivar e parte da planta. O Cu, Cr e Pb são menos translocados para a parte aérea. Na **avaliação da resposta antioxidante**, verifica-se que são ativados diferentes mecanismos antioxidantes em resposta ao stresse oxidativo causado pelos EPTs. Para o Cd, Ni e Zn, observou-se um maior efeito tóxico em folhas, concordante com uma maior translocação para a parte aérea. A adição de corretivos orgânicos apenas provoca uma diminuição na acumulação de Cd na parte edível da planta, não tendo efeito nos outros EPTs.

**Palavras-chave:** elementos potencialmente tóxicos, stresse oxidativo, resposta antioxidante, corretivos orgânicos, *Lactuca sativa*.

## Abstract

The contamination of vegetables by potentially toxic elements (PTEs) is a widespread problem that spans different scientific areas like those related to the environment, agronomy, food production and public health. Lettuce is a leaf vegetable that is highly consumed in Portugal and its production in contaminated media can induce abiotic stress in the plant and lead to its contamination with PTEs.

In the present work, the characterization of the accumulation of different PTEs (Cd, Cr, Pb, Ni, Zn, Cu and Mn) was performed in two cultivars of the *capitata* variety of lettuce (*Lactuca sativa* L.), “*Batavia Dourada da Primavera*” and “*Maravilha das Quatro Estações*”.

In the different experiments performed, the following was evaluated: (i) accumulation and tolerance of lettuce seedlings in an initial stage of development; (ii) characterization of the accumulation and visual indicators of contamination in grown plants; (iii) identification of the defense strategies induced by the different PTEs; (iv) effect of the addition of different organic amendments (cork powder and horse manure) to soils contaminated with PTEs.

The obtained results show that germination is not affected by the presence of PTEs. In seedlings development, Cd and Cu induce early toxic effects while Mn has the least effect. The accumulation of PTEs by lettuce plants is described by different mathematical models that differ between metal, cultivar and plant part. Copper, Cr and Pb are the least translocated to the shoots. Regarding the evaluation of the antioxidant response, different mechanisms are shown to be activated for different PTEs. Cadmium, Ni and Zn caused a stronger toxic effect in leaves in accordance with the higher metal content in this plant part. The addition of organic amendments only reduced the uptake of Cd by lettuce plants but has no effect on the uptake of the other PTEs.

**Keywords:** potentially toxic elements, oxidative stress, antioxidant response, organic amendments.

## Índice Global

Capítulo I – Introdução.....	4
Capítulo II – Materiais e Métodos.....	23
Capítulo III – Influência dos EPTs na germinação e desenvolvimento de plântulas .....	66
Capítulo IV – Avaliação da acumulação de EPTs .....	160
Capítulo V – Avaliação da resposta antioxidante induzida pela acumulação de EPTs...	300
Capítulo VI – Avaliação do efeito da adição de corretivos orgânicos em solo.....	505
Capítulo VII – Conclusões finais.....	683
Anexos.....	693

## Lista de Abreviaturas

AAP – *American Academy of Pediatrics*

Abs – Absorvância

ACP – Análise em componentes principais  
(*Principal Component Analysis, PCA*)

ADN – ácido desoxirribonucleico

AGPI – ácidos gordos polinsaturados

APX – ascorbato-peroxidase

ARs – *Average Requirements, ARs*

ASA – ascorbato reduzido

ASC – ascorbato total

ATP – adenosina trifosfato

ATSDR – *Agency for Toxic Substances  
and Disease Registry*

CAT – catalase

CAX – *CAtion Exchanger*

CDC – *Center for Disease Control and  
Prevention*

CDF – *Cation Diffusion Facilitator*

C<sub>máx</sub> – concentração máxima de EPT na  
planta

CTR/COPT – *COpper TRansporter*

DHA – desidroascorbato

DHAR – desidroascorbato-redutase

DIM – *Daily Dietary Intake*

DP – batavia dourada da primavera

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EAA – espectrofotometria de absorção  
atômica

EAAC - espectrofotometria de absorção  
atômica em chama

EAAE - espectrofotometria de absorção  
atômica eletrotérmica

EAM – espectrofotometria de absorção  
molecular

EB – ensaio branco

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

EFSA – *European Food Safety Authority*

EPA – *Environmental Protection Agency*

EPTs – elementos potencialmente tóxicos

ETC – cadeia transportadora de eletrões  
(*electron transport chain*)

FDA – *Food and Drug Administration*

FPN – *FerroPortiN*

FQ – fitoquelatinas

FT – fator de transferência

GPX – glutationa-peroxidase

GR – glutationa-redutase

GSH – glutationa reduzida

GSSG – glutationa oxidada

His – histidina

HMAAs – *Heavy Metals ATPases*

IARC – *International Agency for Research  
Cancer*

ICP-OES – espectrofotometria de emissão  
por plasma

IDE – ingestão diária estimada



IT – índice de tolerância	PSII – fotossistema II
K <sub>EPT</sub> – coeficiente de acumulação do EPT	PTMI – <i>Provisional Tolerable Monthly Intake</i>
LC <sub>50</sub> – concentração de metal que inibe em 50 % o crescimento	RDI - <i>Recommended Daily Intake</i>
LM – limite máximo	REACH – <i>Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals</i>
m.o. – matéria orgânica	RfD - dose de referência
M4E – maravilha das quatro estações	ROS – espécies reativas de oxigénio ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
MATE - <i>Multi-drug And Toxic compound Extrusion</i>	RSA – <i>Radical Scavenging Activity</i>
MDA – malondialdeído	s/d – sem diferenças significativas
MDHA – monodesidroascorbato	SH – grupo tiol
MDHAR – monodesidroascorbato-redutase	SOD – superóxido-dismutase
MF – massa fresca	TBA – ácido tiobarbitúrico
MRL - níveis máximos de resíduos	TCA – ácido tricloroacético
MS – massa seca	TDI – <i>Tolerable Daily Intake</i>
MT – metalotioneínas	TEAC – <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
n.d. – não detetado	TG – taxa de germinação
NA – nicotianamina	TGSH – glutatona total
NADP <sup>+</sup> - nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidada	TOC – <i>total organic carbon</i>
NADPH – nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reduzida	TWI – <i>Tolerable Weekly Intake</i>
NOAEL – <i>No Observed Adverse Effect Level</i>	UL – <i>Tolerable Upper Intake Level</i>
NRAMP – <i>natural resistance – associated macrophage proteins</i>	VI – valor indicativo
PAL – Fenilalanina amoníaco-liase	via ASA-GSH – via ascorbato-glutatoniana
PAM – <i>Partition Cluster Analysis</i>	VMA – valor máximo admissível
PCR – <i>Plant Cadmium Resistance</i>	WHO – <i>World Health Organization</i>
POD – guaiacol-peroxidase	YSL – <i>Yellow Stripe-Like family</i>
PSI – fotossistema I	ZIP- IRT – <i>Zinc-regulated transporter/Iron-Regulated Transporter</i>



## Preâmbulo

O presente trabalho foi possível de realizar graças a uma bolsa de Doutoramento concedida pela FCT (SFRH/BD/89557/2012), com o apoio da unidade de investigação LEAF – Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem (UID/AGR/04129/2013) que pertence ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa (ISA-UL).

O trabalho apresentado nesta tese consistiu na caracterização da acumulação de elementos potencialmente tóxicos em alface (*Lactuca sativa* L.) e resulta de ensaios e de técnicas analíticas desenvolvidas no ISA-UL, tendo sido organizada, de forma sequencial, tendo em conta a realização de vários ensaios que correspondem aos **Capítulos III, IV, V e VI**. Com este estudo foi possível apresentar comunicações em poster, em conferências nacionais e internacionais, assim como artigos científicos.

O **Capítulo I** constitui uma introdução ao trabalho com o respetivo enquadramento científico, que justifica a escolha do tema, assim como a escolha da planta de alface.

O **Capítulo II** é composto pela caracterização do desenvolvimento experimental do trabalho, descrição das condições experimentais em que decorreram os ensaios para a produção de plantas e o seu delineamento experimental, bem como uma descrição resumida das determinações analíticas utilizadas para material vegetal e solo.

O **Capítulo III** consiste na realização de um estudo de germinação e crescimento de plântulas, cujo objetivo é caracterizar a exposição continuada a diferentes concentrações de Elementos Potencialmente Tóxicos (EPTs) e de que forma estes podem afetar a acumulação e tolerância das plântulas de alface numa fase muito inicial do seu desenvolvimento. O efeito de meios contaminados na germinação e no desenvolvimento das plântulas é avaliado pela aplicação de concentrações crescentes dos diferentes EPTs em estudo, designadamente Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn ou Mn. Neste estudo é ainda possível comparar o comportamento de duas cultivares de alface em relação aos factores em estudo. Com os resultados obtidos neste **Capítulo III** foi possível planear as condições experimentais dos ensaios seguinte.

O **Capítulo IV** consiste na realização de ensaios sem solo com o objetivo de caracterizar a acumulação de duas cultivares de alface e avaliar os indicadores visuais de contaminação. Para cada uma das duas cultivares utilizam-se 5 concentrações crescentes de diferentes elementos (Cd, Cr, Pb, Cu, Ni ou Zn), durante 5 tempos de exposição. Com os resultados obtidos neste **Capítulo IV** foi possível planear as condições experimentais dos ensaios seguinte, nomeadamente escolher as concentrações/tempos de exposição mais adequados.

O **Capítulo V** é efetuado com cultura sem solo e permite caracterizar de forma global os mecanismos e estratégias de defesa da planta induzidos pela acumulação de EPTs. Os ensaios são realizados em hidroponia, porque nestas condições experimentais os EPTs estão diretamente disponíveis para as plantas e as condições de crescimento são mais fáceis de controlar. Neste capítulo é realizado um estudo de resposta metabólica com plantas de alface contaminadas com duas concentrações de EPT (Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn) e 2 tempos de exposição (planta jovem e adulta). Estes ensaios são efetuados apenas para a alface avermelhada dado que, por ter antocianinas na sua composição, será mais interessante estudar os seus mecanismos de resposta antioxidante. Neste sentido, é avaliado o efeito dos EPTs no metabolismo da planta de forma a identificar quais os mecanismos de resposta da alface ao stresse oxidativo, para as situações de contaminação verificadas. Os resultados destes ensaios podem fornecer informações importantes para a seleção de biomarcadores úteis para estudos adicionais em condições de cenários reais em solo.

O **Capítulo VI** descreve os ensaios realizados com cultura com solo artificialmente contaminado com cada um dos EPTs, para explorar condições de crescimento diferentes das utilizadas nos ensaios anteriores, dado que estas influenciam a disponibilidade dos elementos para a planta. Os ensaios em vasos são realizados com 4 concentrações crescentes de cada elemento (Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn), também com a alface avermelhada. Com estes ensaios pretende-se avaliar o efeito da adição de corretivos orgânicos (pó de cortiça e estrume de cavalo) na eventual diminuição da disponibilidade de EPTs que podem ser absorvidos pela planta.

Em cada um dos Capítulos é realizada uma introdução ao tema, com o estado de arte e o respetivo enquadramento científico, uma breve descrição da metodologia experimental específica, a apresentação e discussão dos resultados e conclusões intercalares. Estes Capítulos permitem definir a acumulação de EPTs pela planta de alface em diferentes estágios de desenvolvimento e modos de produção, bem como avaliar a toxicidade inerente de cada EPTs. O presente estudo abre horizontes a outras questões, que são abordadas no **Capítulo VII**.

As publicações que resultaram deste trabalho encontram-se descritas na seguinte Tabela:

- 2018 Sofo, A., I. Moreira, C. E. Gattullo, L. L. Martins & M. Mourato (2018) "Antioxidant responses of edible and model plant species subjected to subtoxic zinc concentrations". Journal of Trace Elements in Medicine and Biology (*in press*).
- Inês N Moreira; Luisa L Martins; Miguel Mourato (2018) "Effect of Cd, Cr, Cu, Mn, Ni and Zn on seed germination and seedling growth of two lettuce cultivars (*Lactuca sativa* L.)". (submetido).
- 
- 2017 Moreira, I.N., Martins, L.L., Mourato, M. P. (2017) "Antioxidant response mechanisms induced by accumulation of potentially toxic elements in red-leaf lettuce", apresentação em poster, XV Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal, Barcelona, 26-29 de Julho, Espanha.
- 
- Moreira, I., Pinto, F., Martins, L. L., Mourato, M. (2015) "Effect of Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn and Mn toxicity on seed germination and seedling growth of two lettuce cultivars (*Lactuca sativa*)", apresentação em poster, XIV Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal, Toledo, 13-17 Julho, Espanha.
- Moreira, I., Pinto, F., Sales, J., Vasconcelos, E., Martins, L. L., Mourato, M. (2015) "Accumulation capacity of Cd by lettuce plants: effect of the application of horse manure and cork powder in artificially contaminated soils.", apresentação em poster, O Solo na Investigação Científica em Portugal. Lisboa, 27 Novembro, Portugal.
- 2015 Moreira, I., Pinto, F., Sales, J., Vasconcelos, E., Martins, L. L., Mourato, M. (2015) "Accumulation capacity of Cd by lettuce plants: effect of the application of horse manure and cork powder in artificially contaminated soils." In Abreu, M.M.; Fangueiro, D.; Santos, E. S. Comemoração do Ano Internacional dos Solos. O solo na Investigação Científica em Portugal. Lisboa (Portugal), ISBN 978-972-8669-65-2, 103-106 pp.
-

Outras publicações realizadas durante o período da tese:

**2016** Moreira, I.N., Pacheco, J., Pinto, F.R., Sales, J., Leitão, I., Martins, L.L., Mourato, M. P. (2016) "Agricultura urbana e ambiente: contaminação por metais pesados de plantas alimentares". Revista Agros, nº1, pag 32-41, AEISA, Portugal.

---

**2015** Moreira, I., Reis, R., Mourato, M., Martins, L.L., (2015) "Oxidative stress induced by cadmium and copper in Brassica rapa leaves: indicators of stress, oxidative damage and antioxidant mechanisms", Communications in Soil Science and Plant Analysis - 46 (19), 2475-2489.

---

**2013** Martins, L.L., Reis, R., Moreira, I., Pinto, F., Sales, J., Mourato, M. (2013) "Antioxidative Response of plants to oxidative stress induced by cadmium", Chapter 3 in Cadmium: Characteristics, Sources of Exposure, Health and Environmental Effects. Ed. Mirza Hasanuzzaman & Masayuki Fujita, Nova Science Publishers, Inc.

---



# Capítulo I

## Introdução





## Índice

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice Global .....	vii
Lista de Abreviaturas.....	viii
Índice de Figuras.....	3
Índice de Tabelas .....	3
Capítulo I – INTRODUÇÃO .....	3
1.1. Objetivo do trabalho.....	4
1.2. Enquadramento científico .....	4
1.3. Elementos Potencialmente Tóxicos .....	5
1.4. Caso de estudo: alface ( <i>Lactuca sativa</i> L.).....	7
1.5. Referências Bibliográficas.....	15

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> – Ciclo vegetativo da alface ( <i>Lactuca sativa</i> L.). .....	12
---	----

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> – Densidade, número atômico e massa atômica dos elementos potencialmente tóxicos utilizados neste trabalho.....	6
<b>Tabela 1.2</b> – Enquadramento taxonómico da alface. ....	8
<b>Tabela 1.3</b> – Classificação das cultivares de alface. ....	10
<b>Tabela 1.4</b> – Composição média das folhas de alface (valores expressos por 100 g de parte edível). ....	11

## **Capítulo I – INTRODUÇÃO**

### **1.1. Objetivo do trabalho**

O objetivo do presente trabalho é fazer uma caracterização da acumulação de elementos potencialmente tóxicos em alface (*Lactuca sativa* L.), por isso, pretende-se:

- identificar os mecanismos de tolerância e toxicidade causados por elementos potencialmente tóxicos (EPTs), em diferentes modos de produção de plantas.
- avaliar e quantificar a acumulação de EPTs pelos diferentes órgãos da planta, bem como avaliar esta contaminação em função da idade da planta de alface.
- clarificar a resposta global da planta de alface ao stresse induzido pela contaminação com EPTs, identificando os mecanismos antioxidantes intracelulares subjacentes à capacidade de tolerância (enzimáticos e não-enzimáticos) e avaliar os indicadores de fitotoxicidade mais adequados para cada EPT.
- avaliar a potencialidade de utilização de corretivos orgânicos naturais na diminuição da acumulação de EPTs em solos artificialmente contaminados.

### **1.2. Enquadramento científico**

A contaminação de produtos hortícolas com EPTs ocorre, maioritariamente, devido à sua presença nos solos, águas de rega e ar, de origem natural ou resultantes de atividades antropogénicas. A contaminação com estes elementos pode exceder significativamente as fontes naturais e, por não serem biodegradáveis, podem persistir no ambiente por tempo indefinido, constituindo um risco de exposição ambiental.

A nível mundial, a necessidade de produzir cada vez maiores quantidades de produtos alimentares para a população, que está constantemente a aumentar, é influenciada por esta problemática da degradação do solo por contaminação química. A poluição dos solos é maior em países industrializados com elevada densidade populacional e, em particular, nas regiões urbanas.

A poluição ambiental causada por EPTs pode prejudicar a saúde dos seres vivos pela sua entrada na cadeia alimentar. Adicionalmente alguns deles têm sido classificados como carcinogénicos e mutagénicos para o ser humano. Estes elementos podem sujeitar as plantas cultivadas para consumo humano, a uma grande variedade de stresses abióticos, podendo

estar biodisponíveis para as plantas tanto através da sua absorção a partir do solo e água, como por deposição na parte aérea.

A alface é uma hortícola muito consumida no mundo, sendo cultivada tanto em explorações agrícolas como em meio urbano, nomeadamente em hortas urbanas, podendo acumular EPTs e constituir uma via de entrada na cadeia alimentar. Os efeitos nocivos para a saúde pública da concentração excessiva de EPTs são a médio/longo prazo uma toxicidade crónica como resultado da bioacumulação pela ingestão ou inalação destes elementos durante períodos de tempo prolongados.

Por estes motivos, numa perspetiva de proteção do consumidor, é de grande importância compreender o efeito destes elementos no crescimento de várias espécies vegetais e identificar a capacidade de acumulação desses contaminantes, sem que se manifestem sintomas visíveis de toxicidade. Este é um tema de elevado interesse prático e transversal a diferentes áreas científicas, sendo simultaneamente um problema ambiental (ar, solos, águas), agronómico/alimentar (produção de culturas alimentares contaminadas) e de saúde pública (contaminação do Homem pela cadeia alimentar).

### 1.3. Elementos Potencialmente Tóxicos

Os termos “metais pesados”, “elementos vestigiais”, “metais vestigiais”, e “elementos inorgânicos vestigiais” são utilizados para designar os elementos que ocorrem em baixas concentrações no ambiente, solos e água, e nos sistemas biológicos, como as plantas (Nagajyoti et al., 2010).

No entanto, a designação metal pesado é normalmente mais utilizada em vez de elemento vestigial, mas estas designações não são necessariamente equivalentes. A definição de metal pesado é variável segundo diferentes autores, sendo obtida através de vários parâmetros, entre os quais a densidade, a massa atómica e o número atómico dos elementos. A controvérsia reside no facto de alguns autores, considerarem que a massa atómica tem que ser superior a 55, o que exclui o Crómio (Cr) e o Manganês (Mn), enquanto outros referem um número atómico superior a 23, o que já inclui estes elementos (DalCorso et al., 2013; Varennes, 2003). Por outro lado, elementos como o Arsénio (As), Boro (B), Flúor (F) e Selénio (Se) são considerados semi-metais ou metalóides, pelo que, evidentemente não são considerados metais pesados, embora sejam importantes elementos vestigiais.

Neste sentido, no presente trabalho, considerou-se um metal pesado como um elemento vestigial metálico, cuja densidade é superior a  $5 \text{ g cm}^{-3}$ , o número atómico é superior a 23 e a massa atómica superior a 55. O termo Elemento Potencialmente Tóxico (EPT) vai ser utilizado

ao longo deste trabalho para fazer referência a estes elementos. Na **Tabela 1.1** estão descritos os EPTs, considerados como metais pesados, utilizados neste trabalho.

**Tabela 1.1** – Densidade, número atômico e massa atômica dos elementos potencialmente tóxicos utilizados neste trabalho.

elemento vestigial metálico	densidade (g cm <sup>-3</sup> )	número atômico	massa atômica (g mol <sup>-1</sup> )
Cádmio (Cd)	8,65	48	112,4
Chumbo (Pb)	11,35	82	207,2
Cobre (Cu)	8,96	29	63,7
Crômio (Cr)	7,19	24	52,0
Níquel (Ni)	8,90	28	58,7
Manganês (Mn)	7,43	25	54,9
Zinco (Zn)	7,87	30	66,4

O alumínio (Al), árgon (Ar), boro (B), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobalto (Co), cobre (Cu), crômio (Cr), flúor (F), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg), molibdênio (Mo), níquel (Ni), selênio (Se) e zinco (Zn) são elementos vestigiais e alguns destes elementos são considerados nutrientes vegetais essenciais como o B, Cu, Mn, Mo, Ni e Zn (Varennnes, 2003).

O estudo dos elementos essenciais é muito importante, pois se a deficiência nestes elementos essenciais pode conduzir a perdas de produção, por outro lado, estes podem tornar-se fitotóxicos para teores que são, por vezes, apenas ligeiramente superiores aos necessários. Este tipo de elemento é facilmente absorvido pelas plantas, pelo que a sua presença em quantidades superiores ao normal pode ser comum.

Por outro lado, os elementos são considerados não essenciais quando não são necessários ao normal desenvolvimento da planta. Este tipo de elemento é considerado poluente do solo porque ocorre de forma generalizada no meio ambiente e, normalmente, encontra-se em concentração superior à esperada ou fora do seu local normal. Os termos poluição e contaminação são muitas vezes considerados sinónimos, porém, contaminação significa que a concentração de uma substância é superior ao que seria de esperar num local em que não estaria presente, ou pelo menos estaria num nível mais baixo enquanto que poluição significa que é necessário que algum organismo seja afetado pela presença dessa substância (Varennnes, 2003).

Neste trabalho optou-se por estudar um conjunto de elementos essenciais (Cu, Ni, Mn e Zn) e não essenciais (Cd, Cr e Pb), com o objetivo de verificar se induzem diferentes mecanismos

de defesa e níveis de acumulação na planta. São também elementos que causam com frequência, problemas de contaminação ambiental.

#### 1.4. Caso de estudo: alface (*Lactuca sativa* L.)

A alface é produzida comercialmente em muitos países por todo o mundo e também é amplamente cultivada em hortas urbanas. É especialmente importante como uma cultura comercial, sendo os maiores produtores mundiais de alface, a China (14.928.768 ton ano<sup>-1</sup>), os Estados Unidos da América (4.177.271 ton ano<sup>-1</sup>) e a União Europeia (4.073.530 ton ano<sup>-1</sup>) (FAOSTAT, 2017) porque a sua produção em larga escala é realizada, preferencialmente, nas zonas temperadas do Hemisfério Norte devido às suas exigências climáticas. Na União Europeia, Espanha e Itália são os principais produtores. Por consequência, a alface foi escolhida para o presente trabalho por ser uma hortícola muito produzida, no mundo, e em particular em Portugal (51.988 ton ano<sup>-1</sup>) (FAOSTAT, 2017).

Em Portugal, a alface é cultivada um pouco por todo o País, tanto ao ar livre como em estufa, durante todo o ano. A produção de alface em estufa realiza-se, normalmente, de Novembro a Abril, prevalecendo o cultivo ao ar livre o resto do ano. É possível produzir durante todo o ano dada a diversidade de cultivares existentes no mercado e a grande variabilidade climática do País. As maiores áreas cultivadas concentram-se perto dos grandes centros populacionais do litoral, nomeadamente, Entre Douro e Minho (concelho da Póvoa de Varzim), Beira Litoral, Algarve, Ribatejo e Oeste, incluindo-se a zona norte de Lisboa conhecida pela zona dos alfaceiros (Loures-Mafra-Sintra) (Almeida, 2006).

Devido ao elevado valor comercial da alface, existe a necessidade de evitar a sua contaminação por EPTs. A alface é uma espécie bioindicadora de EPTs, ou seja, trata-se de um organismo vivo cujo comportamento e estado fisiológico está estritamente relacionado com o meio onde se desenvolve, pelo que a sua observação dá indicações relativas à qualidade e características do meio (Bagur-González et al., 2011; Chapman et al., 2012). Esta hortícola acumula internamente elevados níveis de EPTs devido à eficiente absorção das raízes e consequente translocação para a parte aérea, sendo considerada uma hortícola de folha recomendada para testes de toxicidade padrão (Monteiro et al., 2009; Peijnenburg et al., 2000). É considerada a principal acumuladora de EPTs, como o Cd, Pb e Zn (do Nascimento da Silva et al., 2015; Intawongse e Dean, 2006; Jordão et al., 2006; Nali et al., 2004; Tang et al., 2016; Zorrig et al., 2010).

A *Lactuca sativa* L é considerada uma das hortícolas de folha mais importantes na União Europeia. Esta hortícola de folha é considerada um produto fresco, com baixo valor calórico, que faz parte da dieta mediterrânica, de fácil aquisição e de baixo custo. As folhas de alface

são, quase exclusivamente, utilizadas em fresco pelo próprio consumidor ou comercializadas em produtos de IV gama, sendo normalmente ingeridas cruas (Martínez-Sánchez et al., 2012). É um dos vegetais mais populares em saladas que têm sido consumidos em quantidades crescentes devido à percepção como alimento "saudável" (DuPont et al., 2000). O consumo médio de alface na europa é de 22,5 g dia<sup>-1</sup>, que representa cerca de 6,5 % da ingestão dietética total de vegetais (WHO, 2003). Nos Estados Unidos, o consumo *per capita* de alface, em 2016, atingiu, aproximadamente, 5,6 kg ano<sup>-1</sup> (Statista, 2017).

O enquadramento taxonómico, a classificação de cultivares, a morfologia, o desenvolvimento (ciclo cultural e vegetativo) e as exigências ambientais (climáticas, edáficas), vão ser referidas tendo por base o descrito no Manual de Culturas Hortícolas de Almeida (2006).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das cerca de 100 espécies do género *Lactuca*. Pertence à família *Asteraceae* (sin. *Compositae*) que representa a maior família de dicotiledóneas e abrange aproximadamente 23000 espécies que estão distribuídas por mais de 1500 géneros (Almeida, 2006). Grande parte das Asteráceas é cultivada devido às suas folhas comestíveis, sendo a alface uma das principais culturas hortícolas desta família. Na **Tabela 1.2** está representada a classificação botânica da alface.

**Tabela 1.2** – Enquadramento taxonómico da alface.

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>	<b>Ordem</b>	<i>Asterales</i>
<b>Sub-reino</b>	<i>Tracheobionta</i> (Plantas vasculares)	<b>Família</b>	<i>Asteraceae</i> (sin. <i>Compositae</i> )
<b>Superdivisão</b>	<i>Spermatophyta</i> (Plantas com semente)	<b>Subfamília</b>	<i>Cichorioideae</i>
<b>Divisão</b>	<i>Magnoliophyta</i>	<b>Tribo</b>	<i>Lactuceae</i> (sin <i>Cichorueae</i> )
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>	<b>Género</b>	<i>Lactuca</i> L.
<b>Subclasse</b>	<i>Asteridae</i>	<b>Espécie</b>	<i>Lactuca sativa</i> L.

**Fonte:** adaptado de Almeida (2006).

As cultivares de alface são selecionadas com base em diversos critérios como a variedade, o aspeto das folhas (lisas ou frisadas), a cor das folhas (verde ou vermelha), a consistência das folhas, a aptidão para formar repolho, a adaptação à época de cultura podendo ser de Outono-Inverno ou de Primavera-Verão, a aptidão para sistema de cultura (ao ar livre ou estufa), e pela suscetibilidade à necrose marginal (*tipburn*) e resistência a doenças (Almeida, 2006).

Atualmente consideram-se os grupos de cultivares referidos na **Tabela 1.3**, onde se inclui a designação da respetiva variedade botânica.






A alface é essencialmente constituída por água (94-96 %) contendo também diversos compostos antioxidantes (vitaminas C e E, carotenoides, polifenóis) e fibra que têm uma função significativa na prevenção de várias doenças relacionadas com o stresse oxidativo (Altunkaya et al., 2009; Cheng et al., 2014; Damerum et al., 2015; Durazzo et al., 2014; Kim et al., 2016; Llorach et al., 2008; Nicolle et al., 2004; Oh et al., 2009; Pinto et al., 2014; Serafini et al., 2003). Na **Tabela 1.4** encontra-se a composição média das folhas de alface.

Outros fitoquímicos que também contribuem para este efeito benéfico assim como para as propriedades sensoriais, são as antocianinas e clorofilas (Li et al., 2010), existindo as antocianinas de forma mais abundante nas cultivares avermelhadas (Baslam et al., 2013; Chon et al., 2012; Gazula et al., 2007; Llorach et al., 2008). Para além disso, contém também elementos químicos essenciais como o K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu e Zn (Kawashima e Valente Soares, 2003; Koudela e Petříková, 2008 ; Romani et al., 2002).

Quanto à morfologia, a alface é uma espécie muito polimórfica (Křístková et al., 2008). É uma planta herbácea anual sendo, comumente, designada como uma hortícola de folha. O sistema radicular é aprumado, pouco ramificado e relativamente superficial. A raiz principal de plantas originadas por sementeira direta pode atingir mais de 60 cm. Nas alfaces de repolho, o caule é curto, com 2 a 5 cm durante a fase vegetativa. A parte aérea é bastante polimórfica. Durante a fase de crescimento vegetativo, as folhas encontram-se dispostas em roseta. As folhas são alongadas nos primeiros estados do desenvolvimento e alargam-se quando se inicia a formação do repolho.

Segundo Almeida (2006), o ciclo cultural da alface é relativamente curto. É uma espécie anual sendo a duração do seu ciclo cultural variável, dependendo do tipo de alface e, sobretudo, da época de produção. O ciclo cultural, em estufa, dura cerca de 6 a 8 semanas, na Primavera-Verão, e 10 a 12 semanas, no Inverno.

**Tabela 1.3** – Classificação das cultivares de alface.

Tipo de cultivares	Variedades de <i>Lactuca sativa</i>	Características das variedades
	<b>var. <i>capitata</i></b>	
<b>Bola de manteiga</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Repolho arredondado e pouco compacto.</li> <li>• Folhas lisas, tenras e de nervação penínérvea.</li> <li>• Suscetível a danos mecânicos durante o manuseamento.</li> </ul>
	<b>var. <i>capitata</i></b>	
<b>Batávia</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Repolho arredondado ou ovoide.</li> <li>• Folhas crespas com margens sinuosas ou recortadas.</li> </ul> <p><b>tipo iceberg:</b> batávias americanas cujo repolho é compacto e está nitidamente separado das folhas externas.</p>
	<b>var. <i>longifolia</i></b>	
<b>Romana</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Folhas lisas, alongadas, eretas, com a nervura principal saliente e quebradiça.</li> <li>• Não formam um verdadeiro repolho, mas as folhas do centro da planta podem formar um agrupamento oblongo e pouco compacto.</li> </ul>
	<b>var. <i>acephala</i> (var <i>crispa</i>)</b>	
<b>Acéfala ou corte</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não forma repolho.</li> <li>• Folhas inteiras ou lobadas, com morfologias distintas, colhendo-se as folhas individuais.</li> </ul> <p><b>tipo lollo:</b> folhas com margens finamente frisadas.</p> <p><b>tipo folha de carvalho:</b> folhas com lobos arredondados.</p>
	<b>var. <i>asparagina</i> (var <i>augustana</i>)</b>	
<b>De caule</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• não forma repolho.</li> <li>• caule carnudo.</li> <li>• muito cultivada e consumida na China, sendo cultivada pelos caules que são colhidos quando a planta ainda está no estado vegetativo.</li> </ul>

Fonte: adaptado de Almeida (2006).

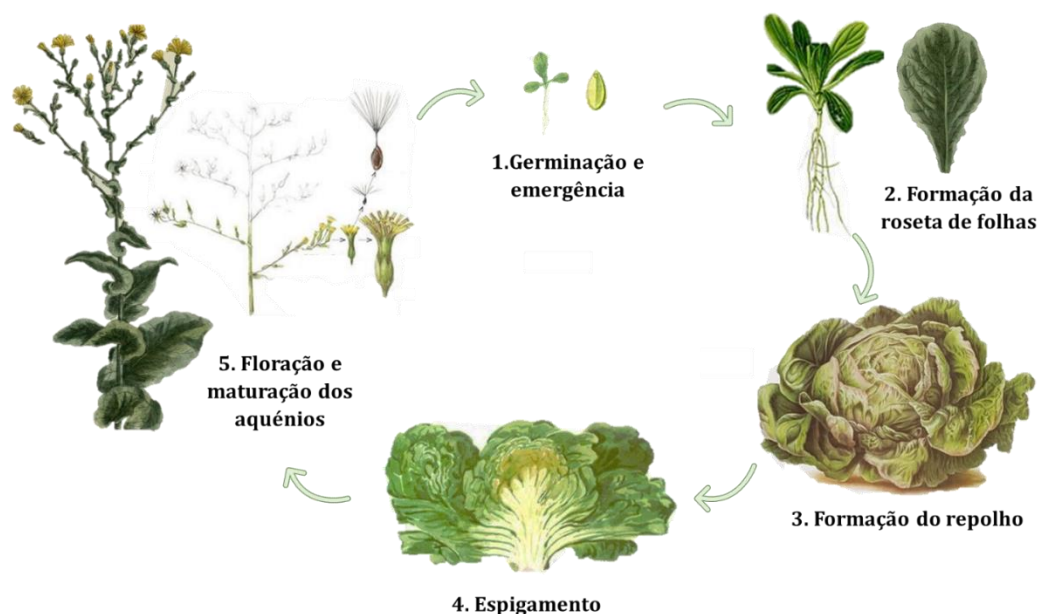


**Tabela 1.4** – Composição média das folhas de alface (valores expressos por 100 g de parte edível).

	<b>var. capitata</b>		<b>var. acephala</b>		<b>var. longifolia</b>
	Bola de manteiga	Iceberg	Folha verde	Folha avermelhada	
<b>Valor Nutricional</b>					
Água (%)	95,63	95,64	94,98	95,64	94,61
Energia (kcal)	13	14	15	16	17
Proteína (%)	1,35	0,90	1,36	1,33	1,23
Lípidos (%)	0,22	0,14	0,15	0,22	0,30
Glúcidos (%)	2,23	2,97	2,87	2,26	3,29
Fibra (%)	1,1	1,20	1,30	0,90	2,10
<b>Elementos químicos</b>					
Cálcio, Ca (mg)	35	18	36	33	33
Ferro, Fe (mg)	1,24	0,41	0,86	1,20	0,97
Magnésio, Mg (mg)	13	7	13	12	14
Fósforo, P (mg)	33	20	29	28	30
Potássio, K (mg)	238	141	194	187	247
Sódio, Na (mg)	5	10	28	25	8
Zinco, Zn (mg)	0,20	0,15	0,18	0,20	0,23
<b>Vitaminas</b>					
Vitamina C,					
Ácido ascórbico	3,7	2,8	9,2	3,7	4,0
(mg)					
Tiamina (mg)	0,057	0,041	0,070	0,064	0,072
Riboflavina (mg)	0,062	0,025	0,080	0,077	0,067
Niacina (mg)	0,357	0,123	0,375	0,321	0,313
Ácido fólico (µg)	73	29	38	36	136
Vitamina A (UI)	3312	502	7405	7492	8710
Vitamina E					
(α-tocoferol) (mg)	0,18	0,18	0,22	0,15	0,13

Fonte: adaptado de USDA (2016).

O ciclo vegetativo pode dividir-se em cinco estados de desenvolvimento: germinação e emergência, formação da roseta de folhas, formação do repolho, espigamento e floração e maturação dos aquênios. As fases reprodutivas do ciclo vegetativo (espigamento, floração e maturação dos aquênios) não fazem parte do ciclo cultural da alface destinada ao consumo (**Figura 1.1**).



**Figura 1.1** – Ciclo vegetativo da alface (*Lactuca sativa* L.).

Relativamente às exigências climáticas, existem cultivares adaptadas às diferentes épocas do ano e a vários climas, permitindo que as diversas variedades de alface se adaptem facilmente às condições climáticas de Portugal, em qualquer época do ano.

A germinação da alface pode ocorrer em 2-3 dias a temperaturas de 20-25 °C, levando 4-6 dias a 15 °C. A 5 °C a faculdade germinativa não é afetada, mas as sementes podem levar mais de 2 semanas para germinar. Para uma boa germinação e emergência, o solo ou substrato devem estar bem humedecidos, ligeiramente abaixo da capacidade de campo. Na fase de germinação, as temperaturas mínimas encontram-se entre 2-5 °C e a máxima de 30 °C (Almeida, 2006; Berrie, 1966 ; Grahn et al., 2014; Gray, 1975 ; Hills e van Staden, 2003).

As condições que são consideradas ótimas para a produção da maioria das cultivares de alface são temperaturas médias de 15 a 20 °C. Na fase de produção de folhas, a temperatura ótima aconselhada é de 12-15 (durante o dia) e de 10-12 °C (durante a noite). Na fase de formação do repolho o ideal é 10-12 °C (dia) e 2-6 °C (noite). A temperatura ótima do solo deve ser entre os 13-15 °C. Temperaturas do solo ou substrato inferiores a 7 °C, favorecem a incidência de necrose marginal. Tanto as temperaturas demasiado baixas como as elevadas prejudicam a qualidade da alface. O desenvolvimento da planta de alface é diminuído quando

as temperaturas médias são inferiores a 7 °C. Quando as temperaturas permanecem acima de 24 °C durante vários dias do ciclo cultural, os repolhos não ficam firmes e os caules tendem a alongar-se. Temperaturas superiores a 33 °C favorecem a floração, inutilizando a cultura (Almeida, 2006; Gent, 2017). A cultura de alface tolera baixa luminosidade. Em condições de baixa intensidade luminosa, o repolho forma-se melhor a baixas temperaturas e o seu desenvolvimento é comprometido quando as temperaturas são superiores a 20 °C. Em condições de dias longos e elevada intensidade luminosa, a formação do repolho é favorecida com temperaturas próximas de 20 °C (Almeida, 2006).

As preferências edáficas da alface são solos frescos e bem drenados, dando-se melhor em solos com textura franca ou argilosa, ricos em matéria orgânica, podendo ser cultivada com sucesso em vários tipos de solo. É sensível à acidez e o pH ótimo situa-se entre 6,5-7,2 (Almeida, 2006).

É uma cultura relativamente pouco exigente em nutrientes, embora, devido ao fraco desenvolvimento radicular e rápido crescimento, necessite de ter os nutrientes facilmente disponíveis. As exportações médias totais de nutrientes pela parte aérea da cultura para os tipos bola de manteiga e batávia são, considerando uma produtividade média de 42 t ha<sup>-1</sup>, de 80 kg N ha<sup>-1</sup>, 40 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> e 170 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> (Santos, 2002).

Devido ao seu ciclo cultural curto e sistema radicular superficial, a alface necessita de nutrientes imediatamente disponíveis no solo ou substrato. No entanto, um excesso de azoto tem inconvenientes, nomeadamente, um atraso na formação do repolho, a produção de repolhos pouco compactos e a indução a uma maior suscetibilidade a doenças. Pode ainda originar a acumulação de nitratos nas folhas, especialmente em condições de baixa luminosidade. As necessidades em N são baixas no início do ciclo cultural, pelo que  $\frac{2}{3}$  da absorção total de N ocorre após a formação do repolho (Almeida, 2006).

A cultura de alface é exigente em água, sendo especialmente importante no início do ciclo cultural. A instalação da cultura por transplantação com raiz protegida origina um sistema radicular muito superficial, que não explora mais do que 10 a 25 cm de profundidade do solo. A frequência de rega deve ser elevada durante o Verão, para evitar o espigamento. O solo deve estar bem regado, próximo da capacidade de campo, na altura da plantação (Sikka e Nayyar, 2012). Após o final da fase de transplantação, a rega deve ser feita de acordo com a evapotranspiração. A duração dos estados de desenvolvimento deve ser ajustada à época do ano (Almeida, 2006).

A instalação da cultura pode ser feita por sementeira direta ou por transplantação. A cultura protegida é sempre instalada por transplantação. Os transplantes são produzidos em

tabuleiros alveolados por viveiristas especializados. O substrato utilizado é geralmente orgânico, à base de turfa. A alface também pode ser cultivada em diversos sistemas de cultura sem solo (Barbosa et al., 2015; Kern et al., 2016).

A alface pode ser colhida em qualquer altura do desenvolvimento vegetativo, sendo este momento determinado pelas exigências e preços de mercado, e pelo compromisso entre o rendimento e qualidade. Os principais atributos de qualidade da alface são a cor e a turgidez das folhas. O calibre da alface é determinado pelo peso por unidade. De acordo com a norma em vigor na União Europeia, as alfaces de repolho têm um calibre mínimo de 150 g para alfaces ao ar livre ou 100 g para produções em estufa (Almeida, 2006).

## 1.5. Referências Bibliográficas

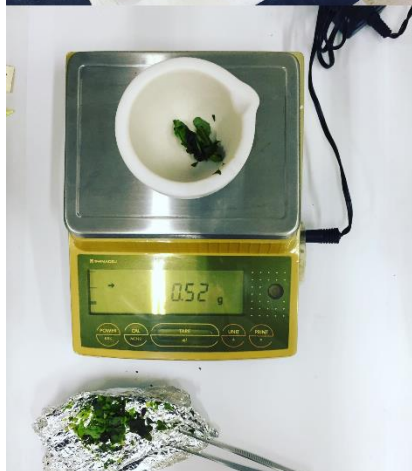
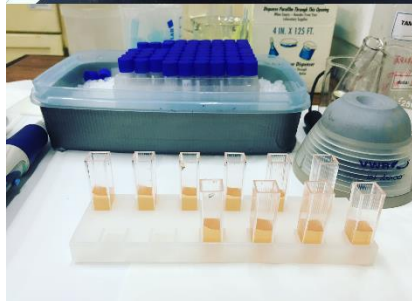
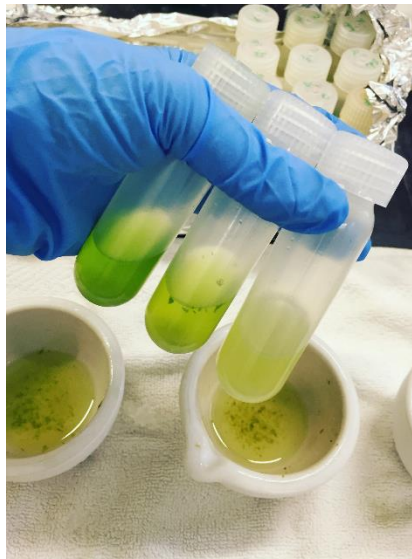
- Almeida, D. (2006). "Manual de Culturas Hortícolas – Volume I.," Editorial Presença, Lisboa.
- Altunkaya, A., Becker, E. M., Gökmen, V., Skibsted, L. H. (2009). Antioxidant activity of lettuce extract (*Lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. *Food Chemistry* **115**, 163-168.
- Bagur-González, M. G., Estepa-Molina, C., Martín-Peinado, F., Morales-Ruano, S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of Soils and Sediments* **11**, 281-289.
- Barbosa, G., Gadelha, F., Kublik, N., Proctor, A., Reichelm, L., Weissinger, E., Wohlleb, G., Halden, R. (2015). Comparison of Land, Water, and Energy Requirements of Lettuce Grown Using Hydroponic vs. Conventional Agricultural Methods. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**, 6879.
- Baslam, M., Morales, F., Garmendia, I., Goicoechea, N. (2013). Nutritional quality of outer and inner leaves of green and red pigmented lettuces (*Lactuca sativa* L.) consumed as salads. *Scientia Horticulturae* **151**, 103-111.
- Berrie, A. M. M. (1966 ). The Effect of Temperature and Light on the Germination of Lettuce Seeds. *Physiologia Plantarum* **19**, 429–436.
- Chapman, E. E. V., Hedrei Helmer, S., Dave, G., Murimboh, J. D. (2012). Utility of bioassays (lettuce, red clover, red fescue, Microtox, MetSTICK, Hyalella, bait lamina) in ecological risk screening of acid metal (Zn) contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **80**, 161-171.
- Cheng, D. M., Pogrebnyak, N., Kuhn, P., Krueger, C. G., Johnson, W. D., Raskin, I. (2014). Development and phytochemical characterization of high polyphenol red lettuce with anti-diabetic properties. *PLoS One* **9**, e91571.
- Chon, S. U., Boo, H. O., Heo, B. G., Gorinstein, S. (2012). Anthocyanin content and the activities of polyphenol oxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in lettuce cultivars. *Int J Food Sci Nutr* **63**, 45-8.
- DalCorso, G., Manara, A., Furini, A. (2013). An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. *Metallomics* **5**, 1117-1132.
- Damerum, A., Selmes, S. L., Biggi, G. F., Clarkson, G. J. J., Rothwell, S. D., Truco, M. J., Michelmore, R. W., Hancock, R. D., Shellcock, C., Chapman, M. A., Taylor, G. (2015). Elucidating the genetic basis of antioxidant status in lettuce (*Lactuca sativa*). *Horticulture Research* **2**, 15055.
- do Nascimento da Silva, E., Heerdt, G., Cidade, M., Pereira, C. D., Morgon, N. H., Cadore, S. (2015). Use of in vitro digestion method and theoretical calculations to evaluate the bioaccessibility of Al, Cd, Fe and Zn in lettuce and cole by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchemical Journal* **119**, 152-158.
- DuPont, M. S., Mondin, Z., Williamson, G., Price, K. R. (2000). Effect of Variety, Processing, and Storage on the Flavonoid Glycoside Content and Composition of Lettuce and Endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 3957-3964.
- Durazzo, A., Azzini, E., Lazzé, M. C., Raguzzini, A., Pizzala, R., Maiani, G., Palomba, L., Maiani, G. (2014). Antioxidants in Italian Head Lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.) Grown in Organic and Conventional Systems under Greenhouse Conditions. *Journal of Food Biochemistry* **38**, 56-61.
- FAOSTAT (2017). The FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Statistical Database. .

- Gazula, A., Kleinhenz, M. D., Scheerens, J. C., Ling, P. P. (2007). Anthocyanin Levels in Nine Lettuce (*Lactuca sativa*) Cultivars: Influence of Planting Date and Relations among Analytic, Instrumented, and Visual Assessments of Color. *HortScience* **42**, 232-238.
- Gent, M. P. N. (2017). Factors Affecting Relative Growth Rate of Lettuce and Spinach in Hydroponics in a Greenhouse. *HortScience* **52** 1742-1747
- Grahn, C., Benedict, C., Miles, C., Hellier, B. (2014). "Screening the USDA Lettuce Germplasm Collection for Rapid Germination Rate Under Cold Conditions."
- Gray, D. (1975 ). Effects of Temperature on the Germination and Emergence of Lettuce (*Lactuca Sativa*, L.) Varieties. *Journal of Horticultural Science* **50**, 349-361.
- Hills, P. N., van Staden, J. (2003). Thermoinhibition of seed germination. *South African Journal of Botany* **69**, 455–46.
- Intawongse, M., Dean, J. R. (2006). Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract. *Food Addit Contam* **23**, 36-48.
- Jordão, C. P., Fialho, L. L., Cecon, P. R., Matos, A. T., Neves, J. C. L., Mendonca, E. S., Fontes, R. L. F. (2006). Effects of Cu, Ni and Zn on lettuce grown in metal-enriched vermicompost amended soil. *Water Air and Soil Pollution* **172**, 21-38.
- Kawashima, L. M., Valente Soares, L. M. (2003). Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in Southern Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis* **16**, 605-611.
- Kern, W., Tapia, M. L., Escalona, V. H., Lizana, L. A. (2016). Comparative evaluation of water footprint and produce losses in 'Española' lettuce cultivated under hydroponic and conventional soil systems. *Acta Hortic.* **1141**, 257-262.
- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis* **49**, 19-34.
- Koudela, M., Petříková, K. (2008 ). Nutrients content and yield in selected cultivars of leaf lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*). *Hort. Sci.* **35**, 99–106.
- Křístková, E., Ivana, D., Lebeda, A., Vinter, V., Novotná, A. (2008). "Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources."
- Li, Z., Zhao, X., Sandhu, A. K., Gu, L. (2010). Effects of Exogenous Absciscic Acid on Yield, Antioxidant Capacities, and Phytochemical Contents of Greenhouse Grown Lettuces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 6503-6509.
- Llorach, R., Martínez-Sánchez, A., Tomás-Barberán, F., Gil, M., Ferreres, F. (2008). Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry* **108**, 1028–1038.
- Martínez-Sánchez, A., Luna, M. C., Selma, M. V., Tudela, J. A., Abad, J., Gil, M. I. (2012). Baby-leaf and multi-leaf of green and red lettuces are suitable raw materials for the fresh-cut industry. *Postharvest Biology and Technology* **63**, 1-10.
- Monteiro, M. S., Santos, C., Soares, A. M. V. M., Mann, R. M. (2009). Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**, 811-818.
- Nagajyoti, P., Lee, K., Sreekanth, T. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* **8**, 199-216.
- Nali, C., Crocicchi, L., Lorenzini, G. (2004). Plants as indicators of urban air pollution (ozone and trace elements) in Pisa, Italy. *J Environ Monit* **6**, 636-45.
- Nicolle, C., Cardinault, N., Gueux, E., Jaffrelo, L., Rock, E., Mazur, A., Amouroux, P., Rémésy, C. (2004). Health effect of vegetable-based diet: lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat. *Clinical Nutrition* **23**, 605-614.

- Oh, M.-M., Carey, E. E., Rajashekar, C. B. (2009). Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 578-583.
- Peijnenburg, W., Baerselman, R., de Groot, A., Jager, T., Leenders, D., Posthuma, L., Van Veen, R. (2000). Quantification of metal bioavailability for lettuce (*Lactuca sativa* L.) in field soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **39**, 420-430.
- Pinto, E., Almeida, A. A., Aguiar, A. A., Ferreira, I. M. (2014). Changes in macrominerals, trace elements and pigments content during lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth: influence of soil composition. *Food Chem* **152**, 603-11.
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Sani, G., Cimato, A., Heimler, D. (2002). Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chemistry* **79**, 337-342.
- Santos, J. Q. (2002). "Fertilização: fundamentos da utilização dos adubos e correctivos," Publicações Europa-América, Mem-Martins, Portugal.
- Serafini, M., Bugianesi, R., Salucci, M., Azzini, E., Raguzzini, A., Maiani, G. (2003). "Effect of acute ingestion of fresh and stored lettuce (*Lactuca sativa*) on plasma total antioxidant capacity and antioxidant levels in human subjects."
- Sikka, R., Nayyar, V. (2012). Cadmium Accumulation and Its Effects on Uptake of Micronutrients in Indian Mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern.] Grown in a Loamy Sand Soil Artificially Contaminated with Cadmium. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **43**, 672-688.
- Statista, T. S. P. (2017). Per capita consumption of fresh lettuce (romaine and leaf) in the United States from 2000 to 2016 (in pounds)\*.
- Tang, X., Pang, Y., Ji, P., Gao, P., Nguyen, T. H., Tong, Y. a. (2016). Cadmium uptake in above-ground parts of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **125**, 102-106.
- USDA, U. s. d. o. a. n. a. l. (2016). Search the USDA national nutrient database for standard reference. Vol. 2017.
- Varenes, A. (2003). "Produtividade dos Solos e Ambiente," Escolar Editora.
- WHO (2003). GEMS/Food regional diets: regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities., Geneva.
- Zorrig, W., Rouached, A., Shahzad, Z., Abdelly, C., Davidian, J.-C., Berthomieu, P. (2010). Identification of three relationships linking cadmium accumulation to cadmium tolerance and zinc and citrate accumulation in lettuce. *Journal of Plant Physiology* **167**, 1239-1247.







# Capítulo II

## Materiais e Métodos





## Índice

Índice .....	21
Índice de Figuras.....	22
Índice de Tabelas.....	22
Capítulo II - MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
2.1. Produção de plantas .....	23
2.1.1. Material vegetal .....	23
2.1.2. Delineamento experimental.....	24
2.1.3. Instalação dos ensaios .....	26
2.2. Colheita, amostragem e conservação de amostras.....	28
2.2.1. Material Vegetal .....	28
2.2.2. Solo.....	30
2.3. Determinações analíticas em material vegetal .....	30
2.3.1. Concentração de elementos químicos.....	30
2.3.1.1. Digestão ácida.....	30
2.3.1.2. Espectrofotometria de absorção atômica.....	31
2.3.1.3. Espectrofotometria de emissão atômica acoplada de plasma induzido .....	32
2.3.2. Espectrofotometria de absorção molecular .....	32
2.3.2.1. Peróxido de hidrogênio .....	33
2.3.2.2. Peroxidação dos lípidos.....	33
2.3.2.3. Atividade antioxidante.....	34
2.3.2.4. Polifenóis totais.....	36
2.3.2.5. Pigmentos.....	37
2.3.2.6. Antocianinas .....	38
2.3.2.7. Ascorbato .....	39
2.3.2.8. Glutathione .....	41
2.3.2.9. Atividade enzimática .....	42
2.3.2.9.1. Extração enzimática .....	43
2.3.2.9.2. Superóxido-dismutase (SOD).....	44
2.3.2.9.3. Catalase (CAT).....	45
2.3.2.9.4. Glutathione-redutase (GR) .....	46
2.3.2.9.5. Guaiacol-peroxidase (POD).....	47
2.3.2.9.6. Ascorbato-peroxidase (APX) .....	48
2.3.2.9.7. Glutathione-peroxidase (GPX).....	49
2.3.2.9.8. Fenilalanina amônia-liase (PAL) .....	50
2.4. Determinações analíticas em solo .....	51
2.4.1. pH e condutividade elétrica .....	51
2.4.2. Carbono orgânico total e matéria orgânica .....	51
2.4.3. Potássio e fósforo extraíveis.....	52
2.4.4. Micronutrientes extraíveis.....	52
2.4.5. Macronutrientes extraíveis.....	53
2.4.6. Análise da fração pseudototal .....	53
2.4.7. Análise da fração extraível .....	54
2.4.8. Azoto nítrico e amoniacal .....	54
2.5. Tratamento estatístico.....	55
2.6. Referências bibliográficas .....	56

### **Índice de Figuras**

Figura 2.1 – As duas cultivares de alface utilizadas no presente estudo. A - cultivar de alface DP; B - cultivar de alface M4E.....	23
Figura 2.2 – Esquema do delineamento experimental para cada ensaio.....	27
Figura 2.3 – Instalações do Horto de Química Agrícola, no Instituto Superior de Agronomia. A – Câmara climatizada ( <i>Ara/lab</i> ); B – Sala de crescimento; C – Estufa de vegetação exterior. ....	28

### **Índice de Tabelas**

Tabela 2.1 – Composição da solução nutritiva de Hoagland modificada e as respectivas concentrações de cada nutriente.....	24
---	----



## Capítulo II - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste Capítulo são descritos todos métodos utilizados para efetuar este trabalho, sendo feita uma breve abordagem sobre a produção de plantas, o delineamento experimental de cada ensaio realizado, o modo de colheita e conservação de amostras e a apresentação das metodologias analíticas efetuadas para material vegetal e solo.

Posteriormente, em cada Capítulo é descrito o modo de produção de plantas específico para cada ensaio e quais os procedimentos experimentais utilizados.

### 2.1. Produção de plantas

#### 2.1.1. Material vegetal

Neste estudo utilizaram-se sementes de duas cultivares de alface (*Lactuca sativa* L., variedade *capitata*), da Vilmorin, com folhas com diferente coloração: uma de folha verde “Batavia Dourada da Primavera” (neste trabalho referida por “DP”) e outra de folha avermelhada “Maravilha das Quatro Estações” (neste trabalho referida por “M4E”) (**Figura 2.1**).



**Figura 2.1** – As duas cultivares de alface utilizadas no presente estudo. A - cultivar de alface DP; B - cultivar de alface M4E.

A alface “Batavia Dourada da Primavera” (DP, **Figura 2.1-A**) pertence à cultivar batávia. É uma planta volumosa e forma um repolho redondo médio. As folhas têm uma coloração verde dourada, são curvadas, tenras e crocantes. A alface “Maravilha das Quatro Estações” (M4E, **Figura 2.1-B**) pertence à cultivar bola de manteiga. É uma planta compacta que forma um

grande repolho. As folhas são verdes avermelhadas, onduladas e muito tenras. Ambas as cultivares apresentam um porte médio a grande e um ciclo cultural de 70 dias.

### 2.1.2. Delineamento experimental

Os diferentes ensaios foram realizados entre os anos de 2013 a 2016. O primeiro delineamento experimental realizado foi o estudo da influência dos EPTs na germinação e desenvolvimento de plântulas (**Capítulo III**) das duas cultivares de alface (DP e M4E) e decorreu entre 2013 e 2014. Foram realizados 7 ensaios, para as duas cultivares em estudo, com Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn ou Mn. Em cada ensaio, procedeu-se à sementeira, ocorrendo a germinação ao fim de 2 dias e o posterior crescimento de plântulas, em placas de petri, onde foi adicionada solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) diluída a 10 % (**Tabela 2.1**). Cada ensaio teve a duração de 10 dias após a sementeira e utilizaram-se 11 concentrações crescentes de cada elemento (no caso do Mn, usaram-se 14 concentrações).

**Tabela 2.1** – Composição da solução nutritiva de Hoagland modificada e as respectivas concentrações de cada nutriente.

Composição	Elemento nutritivo	Concentração de cada elemento nutritivo
<i>solução de macronutrientes</i>		
6,0 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Azoto (N)	18,16 mM
6,0 mM $\text{KNO}_3$	Potássio (K)	7,00 mM
2,5 mM $\text{MgSO}_4$	Fósforo (P)	1,00 mM
1,0 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Cálcio (Ca)	6,00 mM
	Magnésio (Mg)	2,50 mM
	Enxofre (S)	2,63 mM
<i>solução de micronutrientes</i>		
100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_3\text{BO}_3$	Boro (B)	100,0 $\mu\text{M}$
100 $\mu\text{M}$ $\text{MnSO}_4$	Manganês (Mn)	100,0 $\mu\text{M}$
30 $\mu\text{M}$ $\text{ZnSO}_4$	Zinco (Zn)	30,0 $\mu\text{M}$
1 $\mu\text{M}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4$	Molibdénio (Mo)	1,00 $\mu\text{M}$
0,1 $\mu\text{M}$ $\text{CoCl}_2$	Cobalto (Co)	0,10 $\mu\text{M}$
0,1 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	Cobre (Cu)	0,10 $\mu\text{M}$
81,7 $\mu\text{M}$ FeNaEDTA	Ferro (Fe)	81,7 $\mu\text{M}$

A solução nutritiva foi preparada usando soluções stock de macronutrientes (em solução 10 vezes mais concentrada), micronutrientes (em solução 1000 vezes mais concentrada) e FeNaEDTA (concentração final de 81,7  $\mu\text{M}$ ), perfazendo-se o volume com água desionizada conforme o volume final desejado.



Foram realizados dois delineamentos experimentais com cultura sem solo. Num pretendeu-se avaliar a acumulação de EPTs (**Capítulo IV**) e decorreu entre 2014 e 2015, tendo por base os resultados obtidos no delineamento referido anteriormente. Após este período, foi possível planear outro delineamento, sem solo, com o objetivo de estudar a resposta antioxidante induzida pela acumulação de EPTs (**Capítulo IV**) que se realizou entre 2015 e 2016.

Nos dois delineamentos experimentais com cultura sem solo, a germinação e o desenvolvimento de plântulas decorreu em vermiculite. O meio foi sempre humedecido com água desionizada mantendo-se as condições necessárias ao adequado desenvolvimento das plântulas. Após 16 dias, foi possível realizar a transplantação, uma operação minuciosa que envolve a transferência das plântulas da vermiculite para tabuleiros (6 L), com solução nutritiva de Hoagland (**Tabela 2.1**) e arejamento forçado. A separação das plântulas foi feita de forma manual e durante este processo as raízes tiveram de ser muito bem lavadas, com água desionizada, para se remover os resíduos de vermiculite. O objetivo desta fase foi, para além do crescimento da planta, ambientá-la à cultura sem solo e evitar o stresse causado pela transplantação. O pH da solução nutritiva (5,7-6,6) foi monitorizado regularmente em todos os ensaios. Este período de crescimento decorreu durante 21 dias, até apresentarem um desenvolvimento vegetativo adequado à aplicação da contaminação.

Antes da contaminação, verificou-se que as raízes estavam completamente imersas na solução e considerou-se a homogeneidade de dimensões de cada planta por modalidade. Ao longo do ensaio, as plantas foram consumindo a solução e foi necessário repor o volume para que este se mantivesse constante, o arejamento funcionasse de forma correta e as raízes estivessem sempre imersas na solução contaminada. A solução nutritiva foi continuamente arejada por uma bomba de ar para induzir a mistura e permitir uma dispersão adequada de oxigénio pelas raízes (Moreira et al., 2015; Pinto et al., 2017).

No delineamento experimental de avaliação da acumulação de EPTs, utilizaram-se 5 concentrações crescentes de cada elemento, durante 5 tempos de exposição. Foram realizados 6 ensaios, para ambas as cultivares (DP e M4E), com Cd, Cr, Pb, Cu, Ni ou Zn.

No delineamento experimental de avaliação da resposta antioxidante induzida pela acumulação de EPTs foram utilizadas duas concentrações (menor/maior) e testaram-se 2 tempos de exposição (planta jovem/adulta). Este delineamento foi realizado apenas para a alface M4E e foram efetuados 5 ensaios com a contaminação com Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn.

O último delineamento experimental efetuado neste trabalho, decorreu entre 2015 e 2016, e foi de cultura com solo (**Capítulo VI**) onde se pretendeu fazer uma avaliação do efeito da



adição de corretivos orgânicos em solo. A germinação e o desenvolvimento de plântulas realizaram-se em alvéolos com turfa durante 30 dias. Após este período de germinação, as plântulas foram diretamente transplantadas para os vasos que continham solo contaminado. No momento do transplante, pretendeu-se que as plantas apresentassem um tamanho ligeiramente mais desenvolvido para resistirem melhor ao stresse causado pela transplantação para um meio contaminado. No delineamento experimental foi prevista a aplicação de 4 concentrações de cada elemento, e realização de apenas uma colheita. Foram realizados 5 ensaios, um para cada um dos elementos a estudar, Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn.

As condições experimentais utilizadas para cada delineamento estão representadas na **Figura 2.2**. O tempo de crescimento da planta variou em função do delineamento experimental e irá ser descrito pormenorizadamente para cada Capítulo. Em todas as fases de transplantação foi sempre considerado o crescimento homogéneo das plantas.

A contaminação dos meios foi efetuada através da adição de sais dos EPTs utilizados: cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2 \cdot \frac{5}{2} \text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de crómio ( $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), nitrato de chumbo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e sulfato de manganês ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). A contaminação de cada delineamento experimental ocorreu em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo da planta. As condições de contaminação vão ser descritas, posteriormente, para cada Capítulo.

Após se finalizar cada ensaio, todo o material (placas de germinação, tabuleiros ou vasos) foi lavado com detergente, imerso numa solução ácida de  $\text{HNO}_3$  (5 %), sendo, seguidamente, lavado com água desionizada para estar apto para ser novamente utilizado num ensaio posterior.

### **2.1.3. Instalação dos ensaios**

Os ensaios decorreram nas instalações do Horto de Química Agrícola Boaventura de Azevedo do Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem (LEAF), no Instituto Superior de Agronomia (Universidade de Lisboa).





### Germinação e desenvolvimento de plântulas

#### Influência dos EPTs na germinação e desenvolvimento de plântulas



**Capítulo:** III  
**Ano:** 2013-2014  
**Cultivares:** DP e M4E  
**EPTs:** Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn, Mn  
**Duração:** 10 dias após sementeira  
**Nº ensaios:** 14

**Contaminação** (µM):  
Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn, Mn: 0; 5; 10; 25; 50; 100; 150; 250; 350; 500; 750; 1000  
Mn: 2000; 5000; 10000  
**Tempo de exposição:** 10 dias

**Determinações analíticas:**  
- [EPTs] na parte aérea e raiz (2.3.1.1.; 2.3.1.2.)

### Com cultura sem solo

#### Avaliação da acumulação de EPTs



**Capítulo:** IV  
**Ano:** 2014-2015  
**Cultivares:** DP e M4E  
**EPTs:** Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn  
**Duração:** 64 dias após sementeira  
**Nº ensaios:** 12

**Contaminação** (µM):  
Cd: 0; 5; 10; 15; 25; 50  
Cr: 0; 50; 75; 100; 125; 150  
Pb: 0; 50; 75; 100; 125; 150  
Cu: 0; 10; 15; 25; 35; 50  
Ni: 0; 50; 100; 125; 150; 200  
Zn: 0; 50; 100; 125; 150; 200  
**Tempo de exposição:** 2, 6, 13, 20 e 27 dias

**Determinações analíticas:**  
- [EPTs] na parte aérea e raiz (2.3.1.1.; 2.3.1.2.)

#### Avaliação da resposta antioxidante induzida pela acumulação de EPTs



**Capítulo:** V  
**Ano:** 2015-2016  
**Cultivares:** M4E  
**EPTs:** Cd, Cr, Pb, Ni, Zn  
**Duração:** 57 dias após sementeira  
**Nº ensaios:** 5

**Contaminação** (µM):  
Cd: 0; 5; 15  
Cr: 0; 5; 15  
Pb: 0; 125; 150  
Ni: 0; 50; 125  
Zn: 0; 50; 150  
**Tempo de exposição:** 2 e 20 dias

**Determinações analíticas:**  
- [EPTs] na parte aérea (folhas novas e velhas) e raiz (2.3.1.1.; 2.3.1.3.)  
- [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (2.3.2.1.)  
- MDA (2.3.2.2.)  
- TEAC (2.3.2.3.)  
- [polifenóis totais] (2.3.2.4.)  
- [ASC], [ASA], [DHA] (2.3.2.7.)  
- Atividade enzimática: CAT(2.3.2.9.3.), SOD(2.3.2.9.2.), GR (2.3.2.9.4.), POD(2.3.2.9.5.), APX(2.3.2.9.6.), GPX(2.3.2.9.7.), PAL (2.3.2.9.8.)  
- [clorofilas] (2.3.2.5.)  
- [antocianinas] (2.3.2.6.)  
- [TGSH], [GSH], [GSSG] (2.3.3.8.)

### Com cultura com solo

#### Avaliação do efeito da adição de corretivos orgânicos em solo



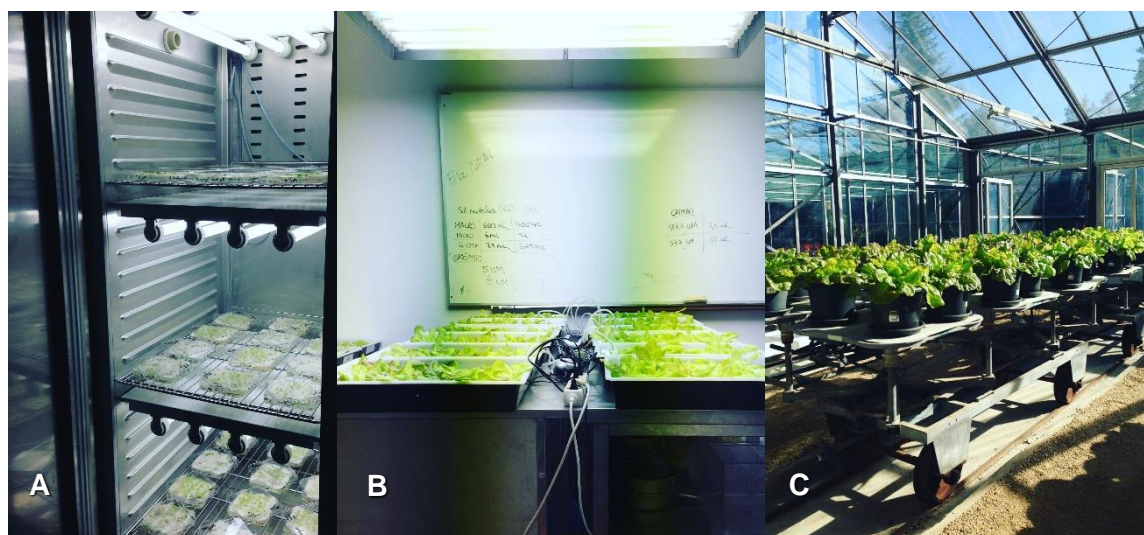
**Capítulo:** VI  
**Ano:** 2015-2016  
**Cultivares:** M4E  
**EPTs:** Cd, Cr, Pb, Ni, Zn  
**Duração:** 80 dias após sementeira  
**Nº ensaios:** 5

**Contaminação** (mg kg<sup>-1</sup>):  
Cd: 0; 1,5; 3; 6; 12  
Cr: 0; 100; 200; 400; 800  
Pb: 0; 150; 300; 600; 1200  
Ni: 0; 37,5; 75; 150; 300  
Zn: 0; 150; 300; 600; 1200  
**Tempo de exposição:** 50 dias  
**Corretivos orgânicos:** cortiça em pó, estrume de cavalo seco

**Determinações analíticas:**  
**Material Vegetal**  
- [EPTs] na parte aérea (2.3.1.1.; 2.3.1.3.)  
- [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (2.3.2.1.)  
- MDA (2.3.2.2.)  
- TEAC (2.3.2.3.)  
- [polifenóis totais] (2.3.2.4.)  
- [ASA] (2.3.2.7.)  
**Solos**  
- pH (2.4.1.)  
- carbono orgânico total e matéria orgânica (2.4.2.)  
- potássio e fósforo extraíveis (2.4.3.)  
- Atividade enzimática: CAT(2.3.2.9.3.), SOD(2.3.2.9.2.), GR (2.3.2.9.4.), POD(2.3.2.9.5.), APX (2.3.2.9.6.), PAL (2.3.2.9.8.)  
- [clorofilas] (2.3.2.5.)  
- [antocianinas] (2.3.2.6.)  
- [EPTs] da fração pseudototal (2.4.6.; 2.3.1.3.) e extraível (2.4.7.; 2.3.1.3.)

Figura 2.2 – Esquema do delineamento experimental para cada ensaio.

A produção de plantas de alface foi realizada em diferentes espaços do Horto de Química Agrícola consoante o ensaio instalado. Os ensaios de germinação e desenvolvimento de plântulas, descrito no **Capítulo III**, realizou-se numa câmara climatizada (*Aralab* Fitoclima D1200) com controlo automático de temperatura, humidade e intensidade luminosa (**Figura 2.3-A**). Os ensaios com cultura sem solo (**Capítulos IV e V**) decorreram numa sala de crescimento com temperatura, humidade e intensidade luminosa controladas (**Figura 2.3-B**). Para ambos os ensaios, as condições de crescimento para a alface foram uma temperatura média de 22/20 °C (diurna/noturna), humidade relativa de 65 % e um fotoperíodo de 12 horas. Os ensaios com cultura com solo, referido no **Capítulo VI**, foi feito numa estufa de vegetação exterior com regulação semiautomática da temperatura (**Figura 2.3-C**).



**Figura 2.3** – Instalações do Horto de Química Agrícola, no Instituto Superior de Agronomia. A – Câmara climatizada (*Aralab*); B – Sala de crescimento; C – Estufa de vegetação exterior.

## 2.2. Colheita, amostragem e conservação de amostras

Em todos os ensaios foram realizadas colheitas de material vegetal e, nos ensaios de cultura com solo, fizeram-se também colheitas de solo. As amostras são secas e/ou congeladas em azoto líquido e mantidas a -80 °C. Neste subcapítulo vão ser descritas as metodologias utilizadas durante a amostragem, colheita e conservação posterior das amostras.

### 2.2.1. Material Vegetal

Com os ensaios de germinação e desenvolvimento de plântulas (**Capítulo III**) foi avaliada a taxa de germinação, o número de plântulas viáveis, o comprimento da raiz e a biomassa (massa fresca) da parte aérea e da raiz. Foram também registados os efeitos visíveis de



toxicidade. Após avaliar estes parâmetros denominados de vegetativos, separaram-se as diferentes partes da planta para serem secas.

Nas plantas produzidas em cultura sem solo procedeu-se da seguinte forma para os diferentes ensaios. Nos ensaios de avaliação da acumulação de EPTs (**Capítulo IV**), analisou-se a parte aérea e a raiz. Nestas plantas apenas foi determinada a biomassa, da parte aérea e da raiz, para as diferentes modalidades, e foram registados os sintomas visíveis de toxicidade. Todo o material vegetal foi seco.

Nos ensaios de avaliação da resposta antioxidante induzida pela acumulação de EPTs (**Capítulo V**) analisou-se as diferentes partes da planta: parte aérea (folhas novas e folhas velhas) e raiz. As folhas velhas foram separadas apenas no caso da planta adulta. Neste ensaio, as amostras foram secas, como foi feito para os ensaios anteriores, e também congeladas.

Nos ensaios de cultura com solo (**Capítulo VI**), separou-se a parte edível da planta, e foi determinada a sua biomassa para as diferentes modalidades do ensaio. Após a colheita, o material vegetal foi seco, como foi feito para os ensaios anteriores, e também congelado.

Para a conservação de material vegetal seco, após a colheita, as folhas foram lavadas com água desionizada sendo o excesso de água retirado por centrifugação manual. As raízes foram colocadas numa solução de 5 mM de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), durante 10 minutos, de modo a eliminar os EPTs adsorvidos à superfície externa da raiz, assegurando que os valores determinados para cada EPT correspondiam especificamente ao EPT absorvido. Depois foram lavadas com água desionizada, secas com papel absorvente (Nocito et al., 2002), e colocadas em estufa, a 60 °C, até massa constante (massa seca, MS). As amostras secas foram, posteriormente, moídas num almofariz com pilão e armazenadas, em frascos fechados, num local seco.

No material vegetal fresco (massa fresca, MF), durante a colheita, foi retirada a nervura principal às folhas e estas foram depois cortadas em pequenas dimensões, de modo a homogeneizar a amostra. As raízes foram colocadas em  $\text{CaCl}_2$ , lavadas e secas em papel absorvente, tal como descrito anteriormente (Nocito et al., 2002), sendo depois também cortadas em frações menores. O material vegetal fresco foi armazenado em pacotes (2 g), sendo congelado, de imediato em azoto líquido, e posteriormente armazenado a -80 °C.

### **2.2.2. Solo**

Por cada vaso foi colhida uma amostra de solo com o auxílio de uma sonda de aço inoxidável. As amostras depois de secas ao ar foram crivadas num crivo de malha de 2 mm, moídas e guardadas, para posterior análise. Tal como no material vegetal, as amostras foram colhidas, em triplicado, para cada modalidade.

## **2.3. Determinações analíticas em material vegetal**

As determinações analíticas foram realizadas tanto em material vegetal seco (2.3.1.) como em material vegetal fresco (2.3.2.).

### **2.3.1. Concentração de elementos químicos**

#### **2.3.1.1. Digestão ácida**

Antes de serem sujeitas às análises espectrofotométricas, as amostras vegetais são secas e são submetidas a digestão ácida. A metodologia foi adaptada do método descrito por Moreira et al. (2015), cujo objetivo foi avaliar a presença dos elementos químicos nas amostras. Os elementos químicos (Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Mn, Ca, Mg, K, Na e Fe) foram determinados por Espectrofotometria de Absorção Atômica em Chama (EAAC) e/ou por Espectrofotometria de Absorção Atômica Eletrotérmica (EAAE), dependendo da quantidade do elemento existente nas amostras.

Neste trabalho utilizou-se um método de decomposição de amostra por via húmida. Na digestão ácida em bloco de aquecimento (DigiPREP MS, SCP Science), as amostras são submetidas a elevadas temperaturas, sem aumento de pressão, durante um período prolongado.

Os parâmetros críticos deste processo são: a temperatura, o tempo, e o tipo de reagentes extratantes utilizados.

A preparação das amostras para a digestão ácida consistiu na pesagem rigorosa de 0,2-0,3 g de material vegetal seco para tubos previamente tarados. Adicionou-se a cada tubo 7,5 mL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), a 65 %, e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl), a 37 %. Em cada digestão, realizou-se um ensaio em branco (EB) e colocou-se uma amostra de material de referência certificado (MRC). Todas as digestões foram realizadas em triplicado.



Neste trabalho utilizaram-se amostras certificadas de alface (WEPAL-IPE-776), espinafre (WEPAL-IPE-984) e grão de trigo (WEPAL-IPE-556), tendo-se utilizado o mesmo procedimento descrito anteriormente para as amostras.

Foram também realizados, inicialmente, ensaios de fortificação para se avaliar a exatidão do método. Os ensaios em meio fortificado consistiram em adicionar às amostras, uma quantidade conhecida do composto que se estava a analisar.

As amostras foram submetidas à digestão num ciclo de 115 minutos (35 min aquecimento → 1º patamar: 10 min a 45 °C → 10 min aquecimento → 2º patamar: 15 min a 90 °C → 15 min aquecimento → 3º patamar: 30 min a 105 °C).

Quando a digestão ácida terminou e se arrefeceu o conteúdo dos tubos à temperatura ambiente, transferiu-se, na *hotte*, o seu conteúdo para balões volumétricos de 25 mL, perfazendo-se o volume com água desionizada. Por fim, as amostras foram filtradas para remover eventuais resíduos em suspensão e guardadas em frascos de vidro até se efetuar a sua leitura. Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos III, IV, V e VI**.

### 2.3.1.2. Espectrofotometria de absorção atômica

A Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA) permite a determinação qualitativa e quantitativa de elementos químicos através da absorção de radiação pelos átomos no estado gasoso.

As determinações analíticas dos elementos químicos por EAA foram realizados num espectrofotómetro Unicam Solaar M e foram efetuadas com atomização em chama ou eletrotérmica, consoante a quantidade de elemento químico presente na amostra.

Foram feitas curvas de calibração para cada elemento a partir de soluções padrão adquiridas comercialmente (Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn, Mn, 1000 mg L<sup>-1</sup>, SCP Science). O intervalo das concentrações das curvas de calibração foi adequado à quantidade que se pretendia medir no extrato e todas as curvas utilizadas tinham um valor de  $R^2 > \pm 0,98$ . Os padrões foram preparados diariamente, antes de cada análise. As leituras dos extratos foram sempre intercaladas com a leitura de padrões de concentração conhecida, EBs e MRCs. Os detalhes relativos às curvas de calibração utilizadas encontram-se no Anexo A (**Tabelas A1 e A2**).

Os resultados obtidos dos elementos em estudo presentes nos MRC, nunca diferiram mais do que 10 % em relação aos valores tabelados. As amostras que apresentaram elevadas



concentrações de elementos para lá da linearidade tiveram de ser diluídas. A concentração de cada elemento químico presente foi obtida através das curvas de calibração e, tendo em conta a massa da amostra, expressa em  $\text{mg kg}^{-1}$  MS. Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos III e IV**.

#### **2.3.1.3. Espectrofotometria de emissão atômica acoplada de plasma induzido**

A Espectrofotometria de Emissão Atômica acoplada de plasma induzido (ICP-OES) permite analisar vários elementos em simultâneo e é aplicável numa larga gama de concentrações.

Nas determinações analíticas dos elementos químicos por ICP-OES acoplada de plasma induzido utilizou-se o equipamento Thermo Scientific iCap 7000 series e também foi necessário realizar padrões, com concentrações conhecidas, a partir de uma solução *stock* multielementar (Cd, Cr, Pb, Ni, Zn,  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , SCP Science, PlasmaQual S22). Os padrões foram preparados diariamente, antes de cada análise, o intervalo das concentrações das curvas de calibração foi adequado à quantidade que se pretendia medir no extrato e todas as curvas utilizadas tinham um valor de  $R^2 > \pm 0,98$ . As leituras dos extratos foram sempre intercaladas com a leitura de padrões de concentração conhecida, EBs e MRCs. Os detalhes relativos às curvas de calibração utilizadas encontram-se no Apêndice A (**Tabela A3**).

Os resultados obtidos dos elementos em estudo presentes nos MRC, nunca diferiram mais do que 10 % em relação aos valores tabelados. A concentração de cada elemento químico presente foi obtida através das curvas de calibração e, tendo em conta a massa da amostra, expresso em  $\text{mg kg}^{-1}$  MS. Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

#### **2.3.2. Espectrofotometria de absorção molecular**

Todas as análises efetuadas por Espectrofotometria de Absorção Molecular (EAM), à exceção da determinação da glutathione, utilizaram o espectrofotómetro AnalyticJena SPECORD 200.

Por EAM determinou-se a concentração de peróxido de hidrogénio, nível de peroxidação dos lípidos, atividade antioxidante, teor de polifenóis totais, quantificação de pigmentos, ascorbato, glutathione e atividade enzimática (SOD, CAT, GR, POD, APX, GPX, PAL).



### 2.3.2.1. Peróxido de hidrogénio

A concentração de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) foi efetuada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Singh et al. (2006). A determinação do teor de  $H_2O_2$  baseia-se na quantificação de iodeto de potássio (KI) porque ocorre a oxidação dos iões iodeto, em meio ácido, pela presença de  $H_2O_2$  havendo uma variação da absorvância a 390 nm.

Na preparação da amostra pesou-se 0,50 g de material vegetal fresco, adicionou-se 2,5 mL de uma solução extratante a 0,1 % (m/v) de ácido tricloroacético (TCA) e macerou-se num almofariz. O extrato foi centrifugado a 12 000 x g (Sigma 03-18 K), durante 15 minutos, e retirou-se 500  $\mu$ L de sobrenadante límpido. Prepararam-se também soluções para a construção da curva padrão a partir de uma solução comercial de  $H_2O_2$  a 30 %. A cada 500  $\mu$ L de sobrenadante ou soluções padrão, adicionaram-se 500  $\mu$ L de tampão fosfato (100 mM, pH 7,6) e 1 mL de KI (1 M). A leitura da absorvância foi realizada, a 390 nm, por EAM. A quantificação foi feita de acordo com a curva padrão ( $y=0,0044x+0,0013$ ,  $R^2 = 0,9974$ ), obtida a partir de uma solução *stock* de  $H_2O_2$  (0,16 mM), com seis padrões com as concentrações de 0, 2,2; 4,4; 6,6; 8,8; e 11,0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em concentração de  $H_2O_2$  por massa fresca de amostra ( $\mu$ g  $H_2O_2$  g<sup>-1</sup> MF):

$$[H_2O_2] = \frac{[CP] \times v_{sob}}{\left(\frac{m_{amostra}}{v_{TCA}}\right) \times 0,5}$$

em que:

[CP] é o valor obtido a partir da equação da curva padrão após leitura da absorvância a 390 nm ( $\mu$ g mL<sup>-1</sup>).

$v_{sob}$  é o volume de sobrenadante (mL).

$m_{amostra}$  é a massa da amostra utilizada (g).

$v_{TCA}$  é o volume de TCA utilizado na extração (mL).

Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

### 2.3.2.2. Peroxidação dos lípidos

O método espectrofotométrico utilizado na determinação do nível de peroxidação dos lípidos foi adaptado de Demiral e Turkan (2005) e permitiu quantificar o malondialdeído (MDA),

produto resultante da peroxidação lipídica, presente na amostra. A adição de ácido tiobarbitúrico (TBA) origina a formação de um complexo MDA-TBA corado (Velikova et al., 2000) havendo uma variação da absorvância a 532 nm. A leitura a 600 nm é uma correção devido à presença de interferentes.

Pesaram-se 0,50 g de material vegetal fresco e procedeu-se à sua maceração num almofariz com 2,5 mL de TCA a 0,1 % (m/v), utilizado como solução extratante. De seguida, centrifugou-se o extrato a 12 000 x g (Sigma 03-18 K), durante 15 minutos, e retirou-se 1 mL de sobrenadante límpido ao qual foi adicionado 4 mL de TCA a 20 % (m/v) contendo 0,5 % (m/v) de TBA. No EB adicionou-se 1 mL de 0,1 % (m/v) de TCA, em vez da amostra. As amostras foram aquecidas a 95/100 °C, durante 30 minutos, com o objetivo de obter uma solução avermelhada corada. De seguida, foram arrefecidas rapidamente num banho de gelo, e realizou-se, novamente, uma centrifugação das amostras, a 10 000 x g, durante 15 minutos. Por fim, foi realizada a leitura da absorvância, a 532 e a 600 nm, sendo a concentração de MDA expressa em  $\mu\text{M MDA g}^{-1} \text{ MF}$ :

$$[\text{MDA}] = \frac{\frac{\text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600}}{\epsilon} \times 1000}{m_{\text{amostra}}}$$

em que:

$\text{Abs}_{532}$ ;  $\text{Abs}_{600}$  são os valores de absorvância obtidos a 532 e 600 nm, respetivamente. A subtração permite corrigir a turbidez inespecífica.

$\epsilon$  é o coeficiente de absortividade molar do MDA ( $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

$m_{\text{amostra}}$  é a massa da amostra utilizada na extração (g).

Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

### 2.3.2.3. Atividade antioxidante

O método de determinação da atividade antioxidante foi adaptado de Swain e Hillis (1959) e baseia-se na diminuição da absorvância, a 517 nm, devido à reação do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), com coloração roxa intensa, pelos antioxidantes presentes no extrato:







Na forma DPPH• o radical absorve a 517 nm mas quando é reduzido por algum antioxidante (AOH) a absorção diminui. Assim, a diminuição da intensidade de cor presente na amostra reflete-se numa maior atividade antioxidante (Brand-Williams, 1995).

Para a extração pesou-se 0,50 g de material vegetal fresco e macerou-se com 2 mL de metanol. Centrifugou-se os extratos a 8000 x g (Sigma 03-18 K), durante 10 minutos, a 4 °C. Os extratos centrifugados repousaram durante 24 horas, a 4 °C, no escuro devido à sensibilidade dos pigmentos à luz. Após este período, foram novamente centrifugados, durante 15 minutos, a 4 °C.

Preparou-se uma solução *stock* de DPPH em metanol (0,61 mM), pelo menos 2 horas antes da medição, para se obter uma solução diária de trabalho de DPPH (45:250 mL solução *stock* DPPH/metanol) cuja absorvância não deve ser inferior a 1,1.

Preparam-se as soluções para a construção da curva padrão para se obter a concentração do teor antioxidante presente nas amostras que neste método foi expresso num antioxidante de referência, o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

A cada 150 µL de sobrenadante ou soluções padrão adicionaram-se 2850 µL de solução diária de trabalho de DPPH. As amostras foram colocadas no escuro, durante 40 minutos, à temperatura ambiente para ocorrer a reação. A leitura da absorvância foi feita a 517 nm contra um EB só com metanol. A leitura da solução diária de trabalho de DPPH foi lida isoladamente.

A quantificação foi feita de acordo com uma curva padrão ( $y = -0,001x + 0,9831$ ,  $R^2 = 0,9883$ ), obtida a partir de uma solução *stock* de Trolox (1 mM) com os seguintes padrões: 0, 75; 150; 300; 500; 600; 700 e 1000 µM.

Os resultados foram obtidos pelas seguintes equações e expressos em % RSA (*Radical Scavenging Activity*) ou TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) definido como a concentração do antioxidante que fornece a mesma percentagem de inibição do Trolox, expresso em mM Trolox 100 g<sup>-1</sup> MF:

$$\%RSA = \frac{Abs_{DPPH} - Abs_{amostra}}{Abs_{DPPH}} \times 100 (\%)$$

$$TEAC = \frac{[CP] \times v_{sob}}{\left(\frac{m_{amostra}}{v_{metanol}}\right) \times 0,15} (\mu M \text{ Trolox } g^{-1})$$

em que:

$Abs_{DPPH}$  é o valor de absorvância obtido para a solução diária de trabalho de DPPH (lido isoladamente).

$Abs_{amostra}$  é o valor de absorvância obtido para a amostra.

[CP] é o valor obtido a partir da equação da curva padrão após leitura da absorvância a 517 nm ( $\mu M$ ).

$v_{sob}$  é o volume de sobrenadante (mL).

$m_{amostra}$  é a massa da amostra utilizada (g).

$v_{metanol}$  é o volume de metanol utilizado na extração (mL).

Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

#### **2.3.2.4. Polifenóis totais**

O método de determinação do teor de polifenóis totais foi adaptado de Waterhouse (2002) e de Ainsworth e Gillespie (2007).

Os compostos fenólicos existentes na amostra são oxidados, em meio alcalino, pelo reagente Folin-Ciocalteu, formando-se complexos de óxidos de tungstênio e de molibdênio com coloração azul esverdeada. A intensidade de cor presente na amostra é diretamente proporcional à quantidade de compostos polifenóis presentes.

A extração do método é igual ao descrito em **2.3.2.3.** para a atividade antioxidante. Prepararam-se as soluções para a construção da curva padrão, obtidas a partir de uma solução *stock* de 5 g L<sup>-1</sup> de ácido gálico em metanol, para se obter a concentração de polifenóis totais presentes nas amostras.

A cada 150  $\mu L$  de sobrenadante, ou soluções padrão, adicionaram-se 140  $\mu L$  de Folin e 2400  $\mu L$  de água desionizada, deixando-se reagir durante 3 minutos. Adicionaram-se 300  $\mu L$  de carbonato de sódio anidro ( $Na_2CO_3$ , 1 M). O reagente Folin deve ser adicionado antes do meio ficar alcalino para evitar a oxidação indesejada dos fenóis pelo ar.

As amostras foram incubadas no escuro, durante 2 horas, à temperatura ambiente para ocorrer a reação. A leitura da absorvância foi feita a 725 nm, contra um EB.



Para calcular a concentração de polifenóis totais em função da absorvância foi feita uma curva padrão ( $y = -0,0039x + 0,0793$ ,  $R^2 = 0,9945$ ), com os seguintes padrões de concentração de 0, 50; 100; 150; 200; 250 e 500 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados foram obtidos pela seguinte equação e expressos em mg polifenóis g<sup>-1</sup> MF:

$$[\text{polifenóis totais}] = \frac{[\text{CP}] \times v_{\text{sob}}}{\left(\frac{m_{\text{amostra}}}{v_{\text{metanol}}}\right) \times 0,15}$$

em que:

[CP] é o valor obtido a partir da equação da curva padrão após leitura da absorvância a 725 nm (mg L<sup>-1</sup>).

$v_{\text{sob}}$  é o volume de sobrenadante (L).

$m_{\text{amostra}}$  é a massa da amostra utilizada (g).

$v_{\text{metanol}}$  é o volume de metanol utilizado na extração (mL).

Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

### 2.3.2.5. Pigmentos

A determinação da concentração de pigmentos foi realizada tendo por base a metodologia descrita por Sims e Gamon (2002).

Na extração dos pigmentos pesou-se 0,10 g de material vegetal fresco e macerou-se, em almofariz frio, com 10 mL de acetona em tampão Tris-HCl (80:20 v/v, 100 mM, pH 7,8). Centrifugou-se a 10 000 x g (Sigma 03-18 K), durante 15 minutos, a 6 °C. Posteriormente fez-se a leitura do sobrenadante, no espectrofotômetro, a 537, 647 e 663 nm. Toda a metodologia foi realizada, o mais possível, ao abrigo da luz.

Os resultados foram obtidos através das seguintes equações que permitiram estimar o teor dos pigmentos (clorofila a-CLOR a, clorofila b-CLOR b, clorofila total-CLOR total e antocianinas-ANTOC) presentes nas folhas:

$$[\text{CLOR a}] = 0,01373 \text{ Abs}_{663} - 0,000897 \text{ Abs}_{537} - 0,003046 \text{ Abs}_{647} \text{ (}\mu\text{mol mL}^{-1}\text{)}$$

$$[\text{CLOR b}] = 0,02405 \text{ Abs}_{647} - 0,004305 \text{ Abs}_{537} - 0,005507 \text{ Abs}_{663} \text{ (}\mu\text{mol mL}^{-1}\text{)}$$

$$[\text{CLOR total}] = \text{CLOR a} + \text{CLOR b} (\mu\text{mol mL}^{-1})$$

$$[\text{ANTOC}] = 0,08173 \text{ Abs}_{537} - 0,00697 \text{ Abs}_{647} - 0,002228 \text{ Abs}_{663} (\mu\text{mol mL}^{-1})$$

Em que:

$\text{Abs}_{537}$ ,  $\text{Abs}_{647}$ ,  $\text{Abs}_{663}$  são os valores de absorvância obtidos para cada comprimento de onda.

Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  pigmento  $\text{g}^{-1}$  MF através da seguinte equação:

$$[\text{pigmento}] = \frac{[\text{EQ}] \times v_{\text{acetona}}}{m_{\text{amostra}}}$$

Em que:

[EQ] é o valor obtido nas equações anteriores para a clorofila a, clorofila b, clorofila total e antocianinas expresso em  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ .

$m_{\text{amostra}}$  é a massa da amostra utilizada na extração (g).

$v_{\text{acetona}}$  é o volume de acetona utilizado na extração (mL).

Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

#### **2.3.2.6. Antocianinas**

Embora os teores de antocianinas possam ser calculados a partir das equações acima, tais resultados não são muito confiáveis, dada a ampla variação na estrutura química das antocianinas e a sua instabilidade em soluções neutras e básicas, como a solução tampão acetona/Tris (Sims e Gamon, 2002). Por esta razão, a determinação do teor de antocianinas é geralmente realizada em meio ácido. Neste sentido, comparou-se o método anterior com o método adaptado por Sims e Gamon (2002) e descrito por Murray e Hackett (1991).

O procedimento da extração das antocianinas foi idêntico ao realizado para a extração dos pigmentos com a exceção de se utilizar como extratante 10 mL de metanol em HCl (90:10 v/v). A leitura da absorvância foi realizada a 529 e 650 nm. A leitura a 650 nm permitiu corrigir o efeito da clorofila, uma vez que o pico de absorvância para a clorofila degradada nestes extratos ocorre a 650 nm.



A antocianina predominante na alface avermelhada é a cianidina-3-glucósido (cyd-3-glu) logo o seu teor foi expresso em equivalentes de cyd-3-glu (Lako et al., 2007; Lee et al., 2005). Para converter o valor de absorvância no teor total de antocianinas ( $\mu\text{mol cyd-3-glu g}^{-1} \text{ MF}$ ) utilizou-se a seguinte expressão:

$$[\text{antocianinas}] = \frac{A \times v_{\text{metanol+HCl}}}{\epsilon \times L \times m_{\text{amostra}} \times 1000}$$

$A = \text{Abs}_{529} - 0,228 \text{ Abs}_{650}$  é o valor de absorvância corrigido com o valor de absorvância a 650 nm.

$\epsilon$  é o coeficiente de absortividade molar para as antocianinas (cyd-3-glu) a 529 nm ( $30000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

$L$  é a espessura da cuvette (cm).

$v_{\text{metanol+HCl}}$  é o volume de metanol e HCl utilizado na extração (mL).

$m_{\text{amostra}}$  é a massa da amostra utilizada na extração para a determinação da concentração de antocianinas (g).

Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

### 2.3.2.7. Ascorbato

A concentração de ascorbato reduzido (ASA), ascorbato oxidado (desidroascorbato, DHA) e do ascorbato total (ASC) foi determinada com a metodologia adaptada de Singh et al. (2006). Este método espectrofotométrico baseia-se na redução, pelo ácido ascórbico presente na amostra, do ião férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ião ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) originando a formação de um quelato de cor vermelha, entre o ião  $\text{Fe}^{2+}$  e o 2,2'-bipiridilo presente no meio reacional:



A extração consistiu na maceração, em almofariz frio com areia inerte, de 0,50 g de material vegetal fresco com 5 mL de solução de extração constituída por 100 mM de Tris-HCl, 1,5 mM de ditioneitol (DTT) e 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), a pH 7,5. Centrifugou-se o extrato a  $22\,000 \times g$  (Sigma 03-18 K), durante 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , e retirou-se o sobrenadante límpido.

Para a determinação da concentração de ASC mediu-se 200 µL de sobrenadante e adicionaram-se 500 µL de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM) com EDTA (5 mM), pH 7,4, e 100 µL de DTT (10 mM). O DTT permite reduzir o DHA a ASA. Incubou-se a mistura reacional, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Após este período, adicionaram-se 100 µL de N-etilmaleimida (0,5 % m/v) que remove o DTT em excesso.

O teor de ASA e as soluções padrão foram determinadas com o mesmo procedimento substituindo-se a adição de DTT e N-etilmaleimida por água desionizada.

O desenvolvimento de cor, em ambas as misturas reacionais, ocorreu com a adição de 400 µL de TCA (10 % m/v), 400 µL de ácido ortofosfórico (44 %, v/v), 400 µL de 2,2'-bipiridilo (0,26 M) em etanol (70 % v/v) e 200 µL de cloreto de ferro III (FeCl<sub>3</sub>, 11 mM). As amostras foram incubadas, na estufa, a 40 °C durante 1 hora, e quantificadas espectralmente a 525 nm.

A quantificação foi feita de acordo com uma curva padrão ( $y = -1,1902x + 0,004$ ,  $R^2 = 0,9990$ ) preparada a partir de uma solução *stock* de ascorbato (10 mM), com os seguintes padrões de concentração de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,4 µmol mL<sup>-1</sup>. Os resultados foram obtidos pelas seguintes equações e expressos em µmol ascorbato g<sup>-1</sup> MF:

$$[\text{ASC; ASA}] = \frac{[\text{CP}] \times v_{\text{Tris-HCl}}}{m_{\text{amostra}}} \times \frac{0,2}{v_{\text{sob}}}$$

em que:

[CP] é o valor obtido a partir da equação da curva padrão após leitura da absorvância a 525 nm (µmol mL<sup>-1</sup>).

$m_{\text{amostra}}$  é a massa da amostra utilizada na extração (g).

$v_{\text{Tris-HCl}}$  é o volume de solução Tris-HCl; DTT e EDTA utilizado na extração (mL).

$v_{\text{sob}}$  é o volume de sobrenadante (mL).

Este método permitiu quantificar o ascorbato na sua forma oxidada (DHA) através da diferença entre os valores obtidos para a forma total e reduzida:

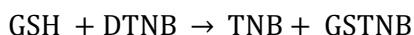
$$\text{DHA} = \text{ASC} - \text{ASA}$$

Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

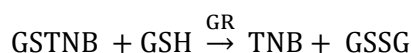


### 2.3.2.8. Glutathiona

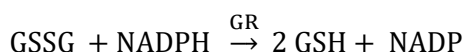
A determinação da glutathiona foi realizada segundo o método espectrofotométrico adaptado de (Anderson et al., 1995) e de Carvalho et al. (2016) que permite quantificar a glutathiona na sua forma reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e total (TGSH). O método baseia-se na reação da GSH com o ácido 5,5-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), com a produção de 5-tio-2-ácido nitrobenzóico (TNB), que apresenta uma coloração amarela:



O complexo glutathiona-TNB (GSTNB) obtido é reduzido pela enzima glutathiona-redutase (GR) para converter a GSH em GSSG:



Estas reações ocorrem rapidamente até toda a GSH ser oxidada a GSSG. A GR também regenera a GSH, a partir da GSSG, a uma taxa constante:



A GSH formada, posteriormente, produz mais TNB. A taxa de produção do TNB é diretamente proporcional à reação que regenera a GSH a partir da GR. Portanto, esta reação também é diretamente proporcional à concentração de GSH presente na amostra. A adição de vinilpiridina permite detetar a GSSG, uma vez que impede a regeneração da GSH, a partir da GSSG.

A extração realizou-se com a maceração, em almofariz frio com areia inerte, de 0,50 g de material vegetal fresco e 5 mL de ácido metafosfórico a 6 % (pH 2,8) contendo EDTA (1 mM). Centrifugou-se o extrato a 22 000 x g (Sigma 03-18 K), durante 15 minutos a 4 °C, e retirou-se o sobrenadante límpido (extrato ácido). De seguida, diluiu-se a amostra 7 vezes com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5 % m/v, pH 7,5) (36 µL amostra:264 µL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), neutralizando-se o extrato ácido.

Utilizou-se diretamente o extrato diluído para quantificar a TGSH. Numa microplaca colocou-se em cada poço: 50 µL de Reagente A (15 mM de EDTA, 0,3 mM de DTNB, 0,04 % de BSA, 110 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O e 40 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O), 40 µL de Reagente B (1 mM de EDTA, 50 mM de Imidazole, 0,02 % de BSA e 1,5 U de GR) e 50 µL de extrato diluído ou extrato diluído incubado com 2-vinilpiridina. Fez-se a leitura deste meio reacional, considerado como EB, a 412 nm num leitor de microplacas (Sinergy HT, BIO-TEK). Posteriormente, adicionou-

se 10 µL de NADPH (9,0 mM) e incubou-se durante 3 horas até ocorrer a reação com o aparecimento da coloração amarela. Após este período realizou-se novamente a leitura a 412 nm das amostras.

Na quantificação da GSSG, ao restante extrato diluído adicionou-se 6 µL de 2- vinilpiridina e incubou-se durante 1 hora, a 25 °C. Após este período, utilizou-se o mesmo procedimento descrito para a determinação da TGSH.

Este método permitiu quantificar a glutathiona na sua forma reduzida através da diferença entre os valores obtidos para a forma total e oxidada:

$$\text{GSH} = \text{TGSH} - \text{GSSG}$$

Os resultados para as concentrações de TGSH, GSSG e GSH, foram obtidos pelas seguintes equações e expressos em µmol glutathiona g<sup>-1</sup> MF:

$$[\text{TGSH}; \text{GSSG}; \text{GSH}] = \frac{[\text{CP}] \times v_{\text{sob}}}{\frac{m_{\text{amostra}}}{V_{\text{ácido metafosfórico}}} \times 0,05} \times fd$$

em que:

[CP] é o valor obtido usando o coeficiente de absortividade molar (ε) do -SH, a 412 nm (0,0136 µM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

v<sub>sob</sub> é o volume de sobrenadante (L).

m<sub>amostra</sub> é a massa da amostra utilizada na extração (g).

V<sub>ácido metafosfórico</sub> é o volume de solução ácido metafosfórico e EDTA utilizado na extração (mL).

fd é o fator de diluição utilizado na amostra (7 x).

Esta determinação analítica foi realizada no **Capítulo V**.

### 2.3.2.9. Atividade enzimática

A velocidade inicial de uma reação catalisada por enzimas é diretamente proporcional à quantidade de enzima presente. Assim, a atividade enzimática traduz-se na quantidade de enzima presente numa amostra que é necessária para consumir um dado substrato ou originar produto por unidade de tempo e em condições experimentais bem definidas. Esta





velocidade é dada pelo declive da reta obtida na representação da absorvância em função do tempo.

A atividade de cada enzima presente nas amostras foi realizada em triplicado, através de métodos específicos de determinação de atividade enzimática (Martins et al., 2014; Moreira et al., 2015; Pinto et al., 2017). A atividade enzimática foi expressa em unidades de enzima (U), definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a decomposição de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto, à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos por unidade de enzima em relação à massa fresca de amostra ( $\text{U g}^{-1} \text{MF}$ ).

#### **2.3.2.9.1. Extração enzimática**

A extração enzimática foi realizada segundo o método adaptado de Rellán-Álvarez et al. (2006) e Alguacil et al. (2003).

Para a determinação da atividade enzimática de superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol-peroxidase (POD) e glutathione-redutase (GR) foi usado o mesmo procedimento na preparação dos extratos. Pesou-se 0,50 g de material vegetal fresco e macerou-se num almofariz frio, em banho de gelo (entre 0 e 4 °C), com 2 mL de tampão de extração, areia inerte e 0,02 g de polivinilpolipirrolidona insolúvel (PVPP) (1 % m/v). O tampão de extração foi constituído por Tris-HCl (100 mM, pH 7,5), 1,5 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 0,1 % (m/v) de Triton X-100. Centrifugou-se o extrato a 12000  $\times g$  (Sigma 03-18 K), durante 20 minutos a 4 °C, e retirou-se o sobrenadante límpido, desprezando o resíduo.

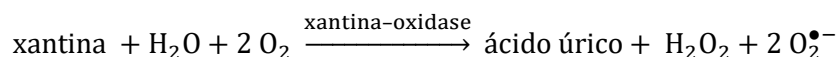
O procedimento de extração da ascorbato-peroxidase (APX) foi igual ao usado anteriormente, apenas diferindo no tampão de extração utilizado. O tampão de extração foi composto por Tris-HCl (100 mM, pH 7,5), 1,5 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 10 mM de ascorbato.

Para a extração da glutathione-peroxidase (GPX), o tampão de extração foi igual ao usado para a extração da CAT, SOD, POD e GR mas com adição de 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) e 5 mM de cisteína.

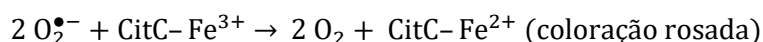
Na extração enzimática da fenilalanina amonia-liase (PAL) a extração foi adaptada do método descrito por Boo et al. (2011). Pesou-se 0,50 g de material vegetal fresco e macerou-se, com areia inerte num almofariz frio, com 1 mL de DTT (3 mM) e 5 mL de tampão borato de sódio (25 mM, pH 8,8), num banho de gelo (entre 0 e 4 °C). Centrifugou-se o extrato a 20 000  $\times g$  (Sigma 03-18 K), durante 20 minutos a 4 °C, e retirou-se o sobrenadante límpido, desprezando o resíduo.

### 2.3.2.9.2. Superóxido-dismutase (SOD)

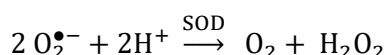
Na determinação da atividade da superóxido-dismutase (EC 1.15.1.1) usou-se o método adaptado de Rubio et al. (2002) baseado na competição do ião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) pela SOD e pelo citocromo-C-férrico (CitC- $Fe^{3+}$ ). Os radicais superóxido são produzidos numa reação catalisada pelo sistema xantina/xantina-oxidase (EC 1.17.3.2):



O CitC- $Fe^{3+}$  é reduzido na presença dos iões  $O_2^{\bullet-}$ , originando uma coloração rosada, resultante da presença de iões  $Fe^{2+}$ :



A SOD presente nas amostras compete com o CitC- $Fe^{3+}$  pela redução dos radicais  $O_2^{\bullet-}$ :



A reação é iniciada com a adição de xantina-oxidase, sendo observadas diferenças na absorvância devido à redução do citocromo C-férrico pelo radical  $O_2^{\bullet-}$ . A velocidade inicial enzimática obteve-se pela medição da diminuição da absorvância devido a uma menor quantidade de produto corado formado (CitC- $Fe^{2+}$ ) ao longo do tempo. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir, em 50 %, a redução do citocromo-C-férrico.

A extração enzimática das amostras realizou-se como descrito em 2.3.2.9.1. O meio reacional usado foi constituído por extrato, solução A (0,05 mM de EDTA, 0,25 mM de xantina e 0,025 mM de citocromo C-férrico em tampão fosfato, 100 mM, pH 7,6), que produz os iões  $O_2^{\bullet-}$  e solução X (0,025 U de xantina-oxidase, em tampão fosfato, 100 mM, pH 7,6).

Neste método foi realizada a leitura de um EB sem adição de extrato excluindo o efeito da competição da SOD, presente na amostra, pelo  $O_2^{\bullet-}$ . A absorvância da amostra deve ser sempre inferior à do EB.

A atividade enzimática foi obtida pela leitura da absorvância, em contínuo, a 550 nm, durante 1-2 minutos. Os resultados da atividade enzimática da SOD foram obtidos pela seguinte expressão e expressos em  $U\ g^{-1}\ MF$ :



$$\text{Atividade enzimática} = \frac{0,5 \times \frac{\Delta \text{Abs}_{\text{EB}}}{\Delta t}}{\frac{\Delta \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\Delta t}} \times \frac{v_t}{v} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1} = \text{U mL}^{-1})$$

em que:

$\Delta \text{Abs}_{\text{EB}}$  é a variação da absorvância do EB, ou seja, o declive da reta obtida no espectrofotômetro durante um intervalo de tempo ( $\Delta t$ ) de 1-2 minutos.

$\Delta \text{Abs}_{\text{amostra}}$  é a variação da absorvância da amostra, ou seja, o declive da reta obtida no espectrofotômetro durante um intervalo de tempo de 1-2 minutos.

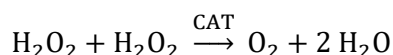
$v$  é o volume de extrato utilizado nas leituras (mL).

$v_t$  é o volume total na cuvette (mL).

Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

### 2.3.2.9.3. Catalase (CAT)

A determinação da atividade da catalase (EC 1.11.1.6) foi adaptada de Aebi (1983), sendo a quantidade de enzima presente proporcional à diminuição de absorvância devido à decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela CAT:



Deste modo, a determinação da velocidade inicial é obtida a partir da taxa de diminuição de absorvância observada.

A preparação da amostra realizou-se como descrito em **2.3.2.9.1**. A atividade enzimática foi determinada num meio reacional com extrato e 11 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em tampão fosfato (100 mM, pH 7,6). A leitura da absorvância foi realizada a 240 nm, durante 2 minutos, contra um EB sem adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de catalase necessária para catalisar a decomposição de  $1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a  $25^\circ\text{C}$ . Os resultados da atividade enzimática da CAT foram obtidos pela seguinte equação e expressos em  $\text{U g}^{-1} \text{MF}$ :

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{1}{L} \times \frac{v_t}{v} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1} = \text{U mL}^{-1})$$

em que:

$\frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t}$  é o declive da reta obtida no espectrofotómetro, a 240 nm, durante um intervalo de tempo ( $\Delta t$ ) de 2 minutos.

$\varepsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm ( $39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

L representa a espessura da cuvette (cm).

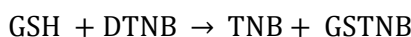
v é o volume de extrato (mL).

$v_t$  é o volume total na cuvette (mL).

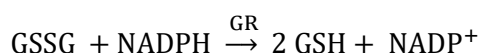
Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

#### 2.3.2.9.4. Glutathiona-redutase (GR)

A determinação da atividade enzimática da glutathiona-redutase (EC 1.8.1.7) foi adaptada do método referido por Shanker et al. (2004) que se baseia no aumento de absorvância obtido com a formação de TNB, devido à redução do DTNB pela GSH, correspondendo esta taxa à velocidade inicial enzimática:



A GR tem como substratos a glutathiona oxidada (GSSG) e o dador de eletrões fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), obtendo-se por oxidação a GSH:



Os extratos foram obtidos como descrito em **2.3.2.9.1**. A atividade enzimática foi dada pela leitura da absorvância a 412 nm, durante 2 minutos, usando um meio reacional, constituído por extrato, 0,75 mM de DTNB, 0,1 mM de NADPH e 1 mM de GSSH, em tampão fosfato (100 mM, pH 7,6) com EDTA (1 mM).

A unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de glutathiona-redutase necessária para reduzir 1  $\mu\text{mol}$  de DTNB por minuto e por mL, à temperatura ambiente. A atividade enzimática da GR foi expressa em  $\text{U g}^{-1} \text{ MF}$  e obtida através da seguinte equação:

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{1}{L} \times \frac{v_t}{v} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = \text{U mL}^{-1})$$



em que:

$\frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t}$  é o declive da reta obtida no espectrofotómetro, a 412 nm, durante um intervalo de tempo ( $\Delta t$ ) de 2 minutos.

$\varepsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar do TNB a 412 nm ( $14,15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

L representa a espessura da cuvette (cm).

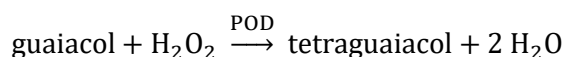
v é o volume de extrato (mL).

$v_t$  é o volume total na cuvette (mL).

Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

#### 2.3.2.9.5. Guaiacol-peroxidase (POD)

O método usado na determinação da atividade enzimática da guaiacol-peroxidase, adaptado de Gajewska et al. (2006), baseou-se na reação catalisada pela POD que promove a oxidação do guaiacol e do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com formação de um produto corado, o tetraguaiacol:



Na leitura espectrofotométrica deve ser observado o aumento da absorvância, ao longo do tempo, devido à oxidação do guaiacol, correspondendo esta taxa à velocidade inicial.

Os extratos foram obtidos como descrito em 2.3.2.9.1. A atividade enzimática da POD foi determinada num meio reacional contendo extrato, 31 mM de guaiacol e 4 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , em tampão de acetato de sódio (200 mM, pH 6,0).

A quantidade de tetraguaiacol formada foi avaliada pela leitura, em contínuo, da absorvância a 470 nm, durante 4 minutos. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de guaiacol-peroxidase necessária para catalisar a decomposição de 1  $\mu\text{mol}$  de guaiacol por minuto e por mL, à temperatura ambiente. A atividade enzimática da POD foi expressa em  $\text{U g}^{-1} \text{ MF}$  e obtida a partir da seguinte equação:

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{1}{L} \times \frac{v_t}{v} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = \text{U mL}^{-1})$$

em que:

$\frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t}$  é o declive da reta obtida no espectrofotómetro, a 470 nm, durante um intervalo de tempo ( $\Delta t$ ) de 4 minutos.

$\varepsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar do guaiacol a 470 nm (26,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

L representa a espessura da cuvette (cm).

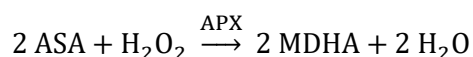
v é o volume de extrato (mL).

v<sub>t</sub> é o volume total na cuvette (mL).

Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

#### 2.3.2.9.6. Ascorbato-peroxidase (APX)

A determinação da atividade enzimática da ascorbato-peroxidase foi baseada no método de Sharma e Dubey (2004), em que ocorre uma diminuição da absorvância, ao longo do tempo, por oxidação do ASA a ascorbato oxidado (monodesidroascorbato, MDHA), correspondendo esta taxa à velocidade inicial enzimática:



A preparação dos extratos foi obtida como descrito em **2.3.2.9.1**. A atividade enzimática da APX foi determinada num meio reacional contendo extrato, 0,25 mM de ascorbato, 0,025 mM de EDTA e 0,25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão fosfato (100 mM, pH 7,6). A leitura da absorvância foi feita a 290 nm, durante 2 minutos, contra um EB sem a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e extrato.

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de ascorbato-peroxidase necessária para catalisar a oxidação de 1 µmol de ascorbato por minuto e por mL, à temperatura ambiente. A atividade enzimática da APX foi expressa em U g<sup>-1</sup> MF e obtida a partir da seguinte equação:

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{1}{L} \times \frac{v_t}{v} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = \text{U mL}^{-1})$$

em que:

$\frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t}$  é o declive da reta obtida no espectrofotómetro, a 290 nm, durante um intervalo de tempo ( $\Delta t$ ) de 2 minutos.



$\varepsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar do ascorbato a 290 nm ( $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

L representa a espessura da cuvette (cm).

v é o volume de extrato (mL).

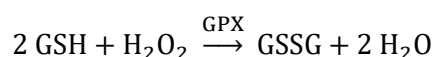
$v_t$  é o volume total na cuvette (mL).

Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

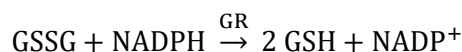
#### 2.3.2.9.7. Glutathiona-peroxidase (GPX)

O método utilizado na determinação da atividade enzimática da glutathiona-peroxidase (Aravind e Prasad, 2005; Nagalakshmi e Prasad, 2001) e baseou-se na diminuição da absorvância resultante do consumo de NADPH.

A GPX catalisa a reação de redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a água, usando a GSH como agente redutor:



A formação da GSSG catalisada pela GPX é utilizada na reciclagem da GSH através da GR, sendo o NADPH oxidado a  $\text{NADP}^+$ :



A GR mantém os níveis de GSH no meio. A diminuição da absorvância a 340 nm, ao longo do tempo, devido à oxidação do NADPH, é diretamente proporcional à atividade enzimática da GPX na amostra.

Os extratos foram obtidos como descrito em **2.3.2.9.1**. A atividade enzimática foi dada pela leitura da absorvância a 340 nm, durante 2 minutos, usando um meio reacional contendo extrato, 114 mM de NaCl, 1,5 mM de GSH, 0,3 mM de NADPH, 0,01 U de GR e 0,25 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,9).

A unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de glutathiona-peroxidase necessária para reduzir 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto e por mL, à temperatura ambiente. Os resultados da atividade enzimática da GPX foram expressos em  $\text{U g}^{-1} \text{ MF}$  e dados pela seguinte equação:

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{1}{L} \times \frac{v_t}{v} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1} = \text{U mL}^{-1})$$

em que:

$\frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t}$  é o declive da reta obtida no espectrofotómetro, a 340 nm, durante um intervalo de tempo ( $\Delta t$ ) de 2 minutos.

$\varepsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar do NADPH a 340 nm ( $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

L representa a espessura da cuvette (cm).

v é o volume de extrato (mL).

$v_t$  é o volume total na cuvette (mL).

Esta determinação analítica foi realizada no **Capítulo V**.

#### **2.3.2.9.8. Fenilalanina amonia-liase (PAL)**

A determinação da atividade enzimática da PAL (EC 4.3.1.24) (Boo et al., 2011; Cheng e Breen, 1991; Nagaranthna et al., 1993) consiste na produção de ácido *trans*-cinâmico através da presença de fenilalanina.

Os extratos foram obtidos como descrito em **2.3.2.9.1**. A determinação da atividade enzimática realizou-se numa mistura reacional contendo extrato, 5 mM de L-fenilalanina e tampão borato de sódio (25 mM, pH 8,8). Realizou-se também um EB seguindo a mesma metodologia, mas em vez de extrato, adicionou-se ao meio reacional DTT (3 mM, 1:5 v/v) em tampão borato de sódio (25 mM, pH 8,8). Incubou-se, na estufa, durante 2 horas, a 40 °C. Para parar a reação foi adicionado HCl (5 M). A atividade enzimática foi medida, em descontinuo, a 290 nm, contra um EB com o mesmo volume da mistura reacional.

A atividade enzimática foi expressa em mmol de ácido *trans*-cinâmico  $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  MF.

$$\text{Atividade enzimática} = \Delta \text{Abs} \times \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{1}{L} \times \frac{v_t}{v} \quad (\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1} = \text{U g}^{-1})$$

em que:

$\Delta \text{Abs}$  é o valor de absorvância obtido no espectrofotómetro, a 290 nm.

$\varepsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar do ácido *trans*-cinâmico a 290 nm ( $17,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).





L representa a espessura da cuvette (cm).

v é o volume de extrato (mL).

$v_t$  é o volume total na cuvette (mL).

Esta determinação analítica foi realizada nos **Capítulos V e VI**.

## 2.4. Determinações analíticas em solo

Na caracterização inicial e completa do solo, procedeu-se à determinação do pH, condutividade elétrica, matéria orgânica, fósforo e potássio extraíveis, azoto nítrico e amoniacal, micronutrientes (Fe, Cu, Zn, Mn) e macronutrientes/bases de troca (Mg, Na, K, Ca).

Para cada ensaio, posteriormente, apenas foram utilizados os seguintes parâmetros: pH e determinação da concentração de elementos químicos, como o fósforo e potássio extraíveis, carbono orgânico total (matéria orgânica), fração pseudototal (Cd, Cr, Pb, Ni e Zn) e fração extraível (Cd, Cr, Pb, Ni e Zn).

### 2.4.1. pH e condutividade elétrica

A determinação do pH e da condutividade elétrica do solo foram determinadas recorrendo ao método descrito por Póvoas e Barral (1992). O pH do solo foi obtido numa suspensão solo/água diluída na proporção 1:2,5 (m/v) e agitada durante 1 hora. Após este período, a leitura do pH foi realizada num potenciómetro (Metrohm model 632). A condutividade elétrica foi medida num condutivímetro (Metrohm model 660), utilizando-se a mesma suspensão solo/água. Esta determinação analítica foi realizada no **Capítulo VI**.

### 2.4.2. Carbono orgânico total e matéria orgânica

O carbono orgânico total foi obtido por combustão via seca, num analisador de carbono (Skalar TOC Formac – Analyzer). Pesaram-se 1,5 g de solo, em cadinhos de quartzo, que foram introduzidos num amostrador automático para serem colocados no forno de combustão a elevada temperatura (1100 °C). A esta temperatura o carbono, presente na amostra, foi totalmente oxidado a CO<sub>2</sub>. Este gás foi, posteriormente, medido por um detetor de infravermelhos não dispersivo específico para o carbono total (%).

O valor obtido para a matéria orgânica (MO) é estimado multiplicando o teor de carbono orgânico total por 1,724, admitindo que a MO contém aproximadamente 58 % de carbono. Esta determinação analítica foi realizada no **Capítulo VI**.

#### **2.4.3. Potássio e fósforo extraíveis**

O potássio (K) e o fósforo (P) extraíveis foram determinados de acordo com o método de Egner-Riehm descrito por Egnér et al. (1960). A quantificação do K foi realizada por espectrofotometria de emissão de chama (Flame Photometer Corning 410) e do P por espectrofotometria de absorção molecular (Hitachi U-2000 UV/vis Spectrophotometer).

A extração foi realizada com a pesagem de 2 g de solo e a adição de 40 mL de solução de extração Egner-Riehm, seguida de agitação durante 2 horas. A solução de extração contendo ácido láctico, acetato de amônio e ácido acético (pH 3,65-3,75) permitiu extrair, simultaneamente, K e P. De seguida os extratos foram centrifugados, a 4000 x g (Centrifuge 5804), durante 7 minutos.

Após este período fez-se leitura direta do K extraível, por aspiração do sobrenadante no fotômetro de chama. A concentração de K extraível foi expressa em mg K<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> MS.

Para se determinar o teor de P extraível utilizou-se 10 mL do restante sobrenadante e adicionou-se 2 mL de solução de foto-rex molíbdico e 1 mL de solução de cloreto estânico em HCl. Deixou-se repousar, durante 30 minutos, até desenvolver cor. Fez-se a leitura de absorvância, a 775 nm, por EAM. As amostras foram diluídas a 20 %. Os resultados do teor de P extraível foram expressos em mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup> MS. Esta determinação analítica foi realizada no **Capítulo VI**.

#### **2.4.4. Micronutrientes extraíveis**

A determinação de micronutrientes extraíveis foi realizada segundo o método descrito por Lakanen e Ervio (1971). A amostra de solo obteve-se por agitação, durante 15 minutos, de 4 g de solo com 40 mL de solução de extração de Lakanen constituída por ácido acético (0,5 M), acetato de amônio (0,5 M) e EDTA (0,02 M). Após este período, a amostra foi centrifugada a 3500 x g (Centrifuge 5804), durante 10 minutos. Os micronutrientes extraíveis (Fe, Cu, Zn e Mn) foram quantificados por EAAC (Unicam Solaar M) e expressos em mg kg<sup>-1</sup> MS. Esta determinação analítica foi realizada no **Capítulo VI**.



#### 2.4.5. Macronutrientes extraíveis

Os macronutrientes extraíveis ou bases de troca foram determinados com base no método de Schollenberger e Simon (1945). Pesaram-se 2 g de solo e adicionou-se 30 mL de acetato de amónio (1 M, pH 7), e agitou-se, durante 15 minutos. De seguida, a amostra do solo foi centrifugada durante 10 minutos a 3500 x g (Centrifuge 5804). Quantificou-se o Ca, Mg, K e Na por EAAC (Unicam Solaar M). As bases de troca são expressas em  $\text{cmol}(+) \text{ kg}^{-1}$  e o Ca e Mg extraíveis em  $\text{mg kg}^{-1}$  MS. Esta determinação analítica foi realizada no **Capítulo VI**.

#### 2.4.6. Análise da fração pseudototal

Na legislação presente em diversos países relativamente à avaliação dos valores máximos permissíveis no solo ou à valorização agrícola de certos resíduos, como as lamas de depuração, refere-se a utilização de extratantes fortes, como a água-régia. Os teores dos elementos extraídos por este tipo de extratante são designados de teores “totais” ou pseudototais.

A análise do teor pseudototal de Cd, Cr, Ni, Pb e Zn foi feita através de uma extração com água régia (mistura de ácido nítrico e ácido clorídrico concentrados, geralmente na proporção 1:3 v/v). Existem diversas combinações de outros extratantes (nitrato de amónio,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , HCl, etc.). O teor de EPTs tem sido analisado no solo na sequência da aplicação da Diretiva 86/278/CE, de 12 de Junho de 1986, referente à valorização agrícola das lamas de depuração e transposta em Portugal pelo Decreto-Lei 276/2009, de 2 de Outubro. A água-régia, segundo a norma ISO 11466:1995, é a metodologia adotada nesse Decreto-Lei para a análise do teor pseudototal de Cd, Cr, Pb, Ni e Zn.

Na análise do teor pseudototal pesaram-se 0,50 g de solo seco e adicionaram-se 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para oxidar a matéria orgânica presente na amostra. Deixou-se repousar cerca de 1 hora para abrandar a reação e diminuir a formação de espuma. Após este período, adicionaram-se 9 mL de HCl, a 37 %, e 3 mL de  $\text{HNO}_3$ , a 65 %. No EB utilizou-se a mesma quantidade de  $\text{HNO}_3$ , HCl e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , à exceção da amostra.

Procedeu-se, de seguida, à digestão das amostras preparadas num ciclo de 160-170 minutos (1 min aquecimento → 1º patamar: 20 min a 45 °C → 1 min aquecimento → 2º patamar: 20 min a 75 °C → 1 min aquecimento → 3º patamar: 120 min a 95 °C).

Quando a digestão ácida terminou e se arrefeceu o conteúdo dos tubos à temperatura ambiente, transferiu-se, na *hotte*, o seu conteúdo para balões volumétricos de 25 mL,

perfazendo-se o volume com água desionizada. As amostras foram filtradas para remover eventuais resíduos em suspensão e guardadas em frascos de vidro até se efetuar a sua leitura. Os resultados foram expressos em mg elemento  $\text{kg}^{-1}$  MS. A posterior leitura dos extratos digeridos foi realizada por ICP-OES. Esta determinação analítica foi realizada no **Capítulo VI**.

#### **2.4.7. Análise da fração extraível**

É cada vez mais aceite que, para além da fração “total” ou pseudototal dos elementos, é indispensável avaliar a mobilidade destes elementos no solo e a sua disponibilidade para as plantas ou outros organismos vivos (Antonious et al., 2013; Rodrigues et al., 2010).

Na extração da fração extraível adaptou-se o método proposto por Houba et al. (2000). Pesaram-se 8 g de solo seco e adicionaram-se 40 mL de  $\text{CaCl}_2$  (0,01 M). De seguida, as amostras foram agitadas, durante 2 h, à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada (Centrifuge 5804), a 4000 x g, durante 7 minutos. Retirou-se 20 mL do sobrenadante límpido e acidificou-se com 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$ , a 65 %. Preparou-se sempre um EB, executando todo o procedimento descrito, excluindo apenas a adição de amostra de solo. A posterior leitura dos extratos digeridos foi realizada por ICP-OES e os resultados foram expressos em mg elemento  $\text{kg}^{-1}$  MS. Esta determinação analítica foi realizada no **Capítulo VI**.

#### **2.4.8. Azoto nítrico e amoniacal**

A quantificação do azoto sob a forma de iões nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amónio ( $\text{NH}_4^+$ ) foi determinada num autoanalisador de fluxo segmentado (SKALAR, SanPlus System) e o método para determinar o  $\text{NH}_4^+$  baseou-se na reação de Berthelot modificada.

Pesaram-se 6 g de solo e adicionaram-se 30 mL de KCl (2 M) e, posteriormente, a amostra foi agitada durante 1 hora. De seguida, foi centrifugada a 3500 x g (Centrifuge 5804), durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos de leitura e inserido no amostrador automático do equipamento, sendo realizada a quantificação por colorimetria em absorção molecular a 540 nm ( $\text{NO}_3^-$ ) e a 660 nm ( $\text{NH}_4^+$ ). Os resultados foram expressos, com base na massa da amostra, em mg  $\text{kg}^{-1}$  MS. Esta determinação analítica foi realizada no **Capítulo VI**.



## 2.5. Tratamento estatístico

Em todo o trabalho foi efetuado um tratamento estatístico adequado ao delineamento experimental realizado para cada ensaio e os dados obtidos foram tratados estatisticamente com o *software* adequado. Em cada Capítulo será referida, em pormenor, a metodologia específica utilizada na análise estatística.

Foram efetuadas análises de variância (ANOVA) a um fator, para a comparação entre as médias, utilizando-se o teste de Tukey, com um nível de confiança de 95 % (**Capítulos IV, V, VI**) com *software* SPSS 13.0 (1989-2004, SPSS Inc.).

Para avaliar diferenças entre médias de amostras controlo e contaminadas realizou-se o teste *t* de Student (**Capítulo III**) com *software* SPSS 13.0 (1989-2004, SPSS Inc.).

No **Capítulos III, IV, V e VI** realizou-se também uma análise multivariada, usando o *software* R (1.0.136 - 2009-2016, RStudio, Inc.), com a aplicação de uma análise em componentes principais e uma análise de partição por *clusters*.

## 2.6. Referências bibliográficas

- Aebi, H. E. (1983). Catalase. In "Methods in Enzymatic Analysis" (U. S. Bergmeyer, ed.), Vol. III. Oxireductases, Transferases, pp. 273-277. Verlag Chemie, Weinheim.
- Ainsworth, E., Gillespie, K. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* **2**, 875-877.
- Alguacil, M. M., Hernandez, J. A., Caravaca, F., Portillo, B., Roldan, A. (2003). Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. *Physiologia Plantarum* **118**, 562-570.
- Anderson, M. D., Prasad, T. K., Stewart, C. R. (1995). Changes in Isozyme Profiles of Catalase, Peroxidase, and Glutathione Reductase during Acclimation to Chilling in Mesocotyls of Maize Seedlings. *Plant Physiol.* **109**, 1247-1257.
- Antonious, G. F., Silitonga, M. R., Tsegaye, T. D., Unrine, J. M., Coolong, T., Snyder, J. C. (2013). Elevated concentrations of trace elements in soil do not necessarily reflect metals available to plants. *J Environ Sci Health B* **48**, 219-25.
- Aravind, P., Prasad, M. N. V. (2005). Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate–glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 107-116.
- Boo, H.-O., Heo, B.-G., Gorinstein, S., Chon, S.-U. (2011). Positive effects of temperature and growth conditions on enzymatic and antioxidant status in lettuce plants. *Plant Science* **181**, 479-484.
- Carvalho, L. C., Coito, J. L., Goncalves, E. F., Chaves, M. M., Amancio, S. (2016). Differential physiological response of the grapevine varieties Touriga Nacional and Trincadeira to combined heat, drought and light stresses. **18 Suppl 1**, 101-11.
- Cheng, G., Breen, P. (1991). Activity of Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) and Concentrations of Anthocyanins and Phenolics in Developing Strawberry Fruit. *J. AMER. Soc. HORT. SCL* **116**, 865-869.
- Decreto-lei (n.º 276/2009). Diário da República, 1.ª série — N.º 192 — 2 de Outubro de 2009 (d. O. d. T. e. d. D. R. Ministério do Ambiente, ed.), Lisboa.
- Demiral, T., Turkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* **53**, 247-257.
- Egnér, H., Riehm, H., Domingo, W. (1960). Untersuchungen über die chemische Bodenanalyse als Grundlage für die Beurteilung des Nährstoffzustandes der Böden. II. Chemische Extraktionsmethoden zur Phosphor und kaliumbestimmung. *Kunigliga Lanbrukshögskolans Annaler* **26**, 199-215.
- Gajewska, E., Sklodowska, M., Slaba, M., Mazur, J. (2006). Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum* **50**, 653-659.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950). The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. California Agriculture Experiment Station Circular 347, University of California, Berkeley, California.
- Houba, G., Temminghoff, M., Gaikhorst, A., van Vark, W. (2000). Soil analysis procedures using 0.01 M calcium chloride as extraction reagent. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **31**, 1299-1396.



- ISO11466:1995 (1995). Soil quality - Extraction of trace elements soluble in aqua regia,. (I. O. f. Standardization, ed.), pp. 6 pp, Genebra.
- Lakanen, E., Ervio, R. (1971). Comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soils. *Acta Agr. Finn.* **23**, 223-232.
- Lako, J., Trenerry, C., Wahlqvist, M., Wattanapenpaiboon, N., Sotheeswaran, S., Premier, R. (2007). Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry* **101** 1727–1741.
- Lee, J., Barnes, K. W., Eisele, T., Giusti, M. M., Haché, J., Hofsommer, H., Koswig, S., Krueger, D. A., Kupina, S., Martin, S. K., Martinsen, B. K., Miller, T. C., Paquette, F., Ryabkova, A., Skrede, G., Trenn, U., Wightman, J. D. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC international* **88**, 1269-1278.
- Martins, L., Mourato, M., Baptista, S., Reis, R., Carvalheiro, F., Almeida, A., Fevereiro, P., Cuypers, A. (2014). Response to oxidative stress induced by cadmium and copper in tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) engineered with the trehalose-6-phosphate synthase gene (AtTPS1). *Acta Physiologiae Plantarum* **36**, 755-765.
- Moreira, I. N., Mourato, M. P., Reis, R., Martins, L. L. (2015). Oxidative stress induced by cadmium and copper in *Brassica rapa* leaves: indicators of stress, oxidative damage and antioxidant mechanisms. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **In press**.
- Murray, R., Hackett, P. (1991). Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. . *Plant Physiology* **97**, 343–351.
- Nagalakshmi, N., Prasad, M. N. V. (2001). Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science* **160**, 291-299.
- Nagaranthna, K., Sudheer, A., Shetty, H. (1993). Phenylalanine in pearl millet seedlings and its relation to down mildew diseases resistance. *J.Exp. Bot.* **44**, 1291-1296.
- Nocito, F. F., Pirovano, L., Cocucci, M., Sacchi, G. A. (2002). Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiology* **129**, 1872-1879.
- Pinto, F. R., Mourato, M. P., Sales, J. R., Moreira, I. N., Martins, L. L. (2017). Oxidative stress response in spinach plants induced by cadmium. *Journal of Plant Nutrition* **40**, 268-276.
- Póvoas, I., Barral, M. (1992). "Métodos de análises de solos.," Comunicação do Instituto de Investigação Científica Tropical.
- Rellán-Álvarez, R., Ortega-Villasante, C., Álvarez-Fernández, A., Campo, F., Hernández, L. (2006). Stress Responses of *Zea mays* to Cadmium and Mercury. *Plant and Soil* **279**, 41-50.
- Rodrigues, S. M., Henriques, B., da Silva, E. F., Pereira, M. E., Duarte, A. C., Römken, P. F. A. M. (2010). Evaluation of an approach for the characterization of reactive and available pools of twenty potentially toxic elements in soils: Part I – The role of key soil properties in the variation of contaminants' reactivity. *Chemosphere* **81**, 1549-1559.
- Rubio, M. C., Gonzalez, E. M., Minchin, F. R., Webb, K. J., Arrese-Igor, C., Ramos, J., Becana, M. (2002). Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of



- transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum* **115**, 531-540.
- Schollenberger, C., Simon, R. H. (1945). DETERMINATION OF EXCHANGE CAPACITY AND EXCHANGEABLE BASES IN SOIL—AMMONIUM ACETATE METHOD. *Soil Science* **59**, 13-24.
- Shanker, A. K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandrashekar, C. N., Pathmanabhan, G. (2004). Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Science* **166**, 1035-1043.
- Sharma, P., Dubey, R. S. (2004). Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Science* **167**, 541-550.
- Sims, D. A., Gamon, J. A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* **81**, 337-354.
- Singh, N., Ma, L. Q., Srivastava, M., Rathinasabapathi, B. (2006). Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science* **170**, 274-282.
- Swain, T., Hillis, E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. - The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **10**, 63-68.
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* **151** 59–66.
- Waterhouse, L. (2002). Determination of total phenolics. In "Current protocols in food analytical chemistry." (R. E. Wrolstad, ed.). John Wiley & Sons, New York.





# Capítulo III

## Influência dos EPTs na germinação e desenvolvimento de plântulas



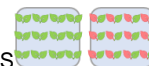
## Índice

Índice .....	61
Índice de Figuras.....	62
Índice de Tabelas.....	64
Resumo.....	65
Capítulo III – INFLUÊNCIA DOS EPTs NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS .....	66
3.1. Objetivo .....	66
3.2. Introdução.....	66
3.2.1. Germinação e Emergência .....	66
3.2.2. Etapas da Germinação .....	68
3.2.3. Efeitos fisiológicos na germinação das sementes e no crescimento das plântulas.....	70
3.2.3.1. Estimulação da germinação por baixas concentrações de EPTs .....	70
3.2.3.2. Efeito dos EPTs na germinação e no crescimento das plântulas .....	72
3.3. Material e Métodos .....	76
3.3.1. Material Vegetal .....	76
3.3.2. Delineamento experimental.....	77
3.3.3. Instalação dos ensaios.....	79
3.3.4. Colheita, amostragem e conservação de amostras.....	80
3.3.5. Determinações analíticas .....	80
3.3.5.1. Determinação da taxa de germinação e número de plântulas viáveis .....	81
3.3.5.2. Determinação da biomassa e comprimento da raiz.....	81
3.3.5.3. Índices de vigor das plântulas e de tolerância da raiz .....	81
3.3.5.4. Cálculo do índice de inibição.....	82
3.3.5.5. Determinação da concentração de elementos químicos .....	83
3.3.6. Tratamento estatístico.....	83
3.4. Resultados e discussão .....	84
3.4.1. Sintomas visíveis de toxicidade .....	84
3.4.2. Taxa de germinação e plântulas viáveis .....	94
3.4.3. Massa fresca da parte aérea e raiz .....	100
3.4.4. Comprimento da raiz.....	119
3.4.5. Absorção e acumulação do EPT .....	128
3.5. Avaliação da toxicidade dos EPTs estudados.....	132
3.6. Conclusões .....	138
3.7. Referências Bibliográficas.....	141



## Índice de Figuras

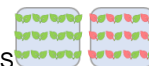
<b>Figura 3.1</b> – Representação do processo germinativo da plântula de alface. ....	67
<b>Figura 3.2</b> – Evolução das principais alterações metabólicas que ocorrem ao longo das diferentes fases da embebição. Fonte: adaptado de Bewley (1997) e Nonogakia et al. (2010). ....	69
<b>Figura 3.3</b> – Representação esquemática do efeito dos ROS nas sementes durante a embebição. Fonte: adaptado de Bailly et al. (2008). ....	72
<b>Figura 3.4</b> – Representação esquemática do efeito dos EPTs nas sementes. Fonte: adaptado de Kranner e Colville (2011). ....	76
<b>Figura 3.5</b> – As duas cultivares de alface utilizadas nos ensaios de germinação e crescimento de plântulas. A - Alface Batavia Dourada da Primavera (DP); B - Alface Maravilha das Quatro Estações (M4E). ....	77
<b>Figura 3.6</b> – Representação esquemática dos ensaios de germinação e desenvolvimento de plântulas. ....	78
<b>Figura 3.7</b> – Ensaios de germinação e crescimento de plântulas instalados, na câmara climatizada, no Horto de Química Agrícola. A-plântulas ao fim de 10 dias de crescimento; B- etapa de germinação; C-ensaio instalado; D-colheita das amostras; E-conservação do material vegetal. ....	80
<b>Figura 3.8</b> – Exemplificação da medição do comprimento da raiz da plântula. ....	81
<b>Figura 3.9</b> – Número de plântulas viáveis (PV) e taxa de germinação (TG) (%), na alface DP, expostas a Cd, Cr ou Pb, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	95
<b>Figura 3.10</b> – Número de plântulas viáveis (PV) e taxa de germinação (TG) (%), na alface DP, expostas a Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	95
<b>Figura 3.11</b> – Número de plântulas viáveis (PV) e taxa de germinação (TG) (%), na alface M4E, expostas a Cd, Cr ou Pb, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	96
<b>Figura 3.12</b> – Número de plântulas viáveis (PV) e taxa de germinação (TG) (%), na alface M4E, expostas a Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	96
<b>Figura 3.13</b> – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alface DP (a) e alface M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Cd, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	102
<b>Figura 3.14</b> – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alface DP (a) e alface M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Cr, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	103
<b>Figura 3.15</b> – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alface DP (a) e alface M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Pb, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	104
<b>Figura 3.16</b> – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alface DP (a) e alface M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Cu, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	105
<b>Figura 3.17</b> – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alface DP (a) e alface M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Ni, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	106
<b>Figura 3.18</b> – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alface DP (a) e alface M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Zn, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	107



- Figura 3.19** – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alface DP (a) e alface M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Mn, ao fim de 10 dias de tratamento. ....108
- Figura 3.20** – Comprimento da raiz das plântulas de alface DP, submetidas a diferentes concentrações de Cd, Cr ou Pb, ao fim de 10 dias de tratamento. ....120
- Figura 3.21** – Comprimento da raiz das plântulas de alface DP, submetidas a diferentes concentrações de Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento. ....120
- Figura 3.22** – Comprimento da raiz das plântulas de alface M4E, submetidas a diferentes concentrações de Cd, Cr ou Pb, ao fim de 10 dias de tratamento. ....121
- Figura 3.23** – Comprimento da raiz das plântulas de alface M4E, submetidas a diferentes concentrações de Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento. ....121
- Figura 3.24** – Concentração de Cd (a), Cr (b), Pb (c), Cu (d), Ni (e), Zn (f) ou Mn (g) na parte aérea das plântulas de alface DP, após exposição ao respectivo EPT, ao fim de 10 dias de tratamento. ....130
- Figura 3.25** – Concentração de Cd (a), Cr (b), Pb (c), Cu (d), Ni (e), Zn (f) ou Mn (g) na parte aérea das plântulas de alface M4E, após exposição ao respectivo EPT, ao fim de 10 dias de tratamento. ....131
- Figura 3.26** – Análise em componentes principais realizada para os indivíduos expostos a diferentes concentrações dos EPT: Cd (a), Cr (b), Pb (c), Cu (d), Ni (e), Zn (f), Mn (g) e total (h), considerando 6 variáveis: *bioshoot*, *bioroot*, *lengthroot*, *uptake*, *TG* e *plantviav*. ....134
- Figura 3.27** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos expostos a diferentes concentrações de Cd (a), Cr (b), Pb (c), Cu (d), Ni (e), Zn (f) ou Mn (g), ao fim de 10 dias de tratamento. Estas duas componentes explicam 80,30 % (Cd), 83,21 % (Cr), 81,87 % (Pb), 81,27 % (Cu), 85,97 % (Ni), 82,97 % (Zn) ou 90,73 % (Mn) da variabilidade. ....136

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 3.1</b> – Cronograma utilizado no delineamento experimental dos ensaios de germinação e desenvolvimento de plântulas. ....	79
<b>Tabela 3.2</b> – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Cd. ....	85
<b>Tabela 3.3</b> – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Cr. ....	86
<b>Tabela 3.4</b> – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Pb. ....	87
<b>Tabela 3.5</b> – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Cu. ....	88
<b>Tabela 3.6</b> – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Ni. ....	89
<b>Tabela 3.7</b> – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Zn. ....	90
<b>Tabela 3.8</b> – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Mn. ....	91
<b>Tabela 3.9</b> – Índice de inibição do crescimento, da parte aérea e da raiz, em plântulas de alface DP (a) e M4E (b), sujeitas a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	111
<b>Tabela 3.10</b> – Índice de vigor das plântulas para as duas cultivares de alface, submetidas a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	112
<b>Tabela 3.11</b> – Efeito da presença de EPTs na massa fresca, da parte aérea e da raiz, em diversos estudos realizados por outros autores. ....	115
<b>Tabela 3.12</b> – Índice de inibição do comprimento da raiz das duas cultivares de alface, sujeitas a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	123
<b>Tabela 3.13</b> – Índice de tolerância da raiz para as duas cultivares de alface, sujeitas a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento. ....	123
<b>Tabela 3.14</b> – Efeito da presença de EPTs no comprimento da raiz em diversos estudos realizados por outros autores. ....	125
<b>Tabela 3.15</b> – Matriz de correlações entre as variáveis e as componentes principais da ACP. ....	133
<b>Tabela 3.16</b> – Resumo do efeito de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn e Mn nos ensaios de germinação e desenvolvimento de plântulas. ....	139



## Resumo

Neste capítulo é estudado o efeito de EPTs na germinação e no crescimento de plântulas de duas cultivares de alface. Nestes ensaios são testadas diferentes concentrações de Cd, Cr, Ni, Cu, Ni, Zn ou Mn, e analisados diversos parâmetros relacionados com o seu efeito na planta, designadamente sintomas visíveis de toxicidade, taxa de germinação (TG), número de plântulas viáveis, biomassa da raiz e parte aérea, comprimento da raiz, índice de vigor das plântulas e de tolerância da raiz.

Para ambas as cultivares, a TG não é influenciada pela presença de EPTs. As sementes de alface de ambas as cultivares, manifestam-se bastante tolerantes à presença destes elementos durante o processo germinativo. Isto ocorre, provavelmente, devido ao efeito barreira do tegumento da semente, que impede que os elementos entrem em contacto com o embrião. As plântulas viáveis também não são influenciadas pelo efeito tóxico destes elementos, à exceção do Cd, sugerindo que a alface parece ser sensível à presença de concentrações elevadas deste elemento (1000  $\mu\text{M}$ ).

Os resultados indicam que o crescimento das plântulas é mais sensível que a germinação, sendo observada uma diminuição da biomassa da raiz e parte aérea, comprimento da raiz, índice de vigor das plântulas e de tolerância da raiz, com o aumento da concentração de EPT, assim como o aparecimento de sintomas visíveis de toxicidade. O Cd e Cu são os EPTs que induzem efeitos tóxicos mais acentuados nas plântulas, enquanto o Mn é o elemento com menor toxicidade. Existem diferenças entre o comportamento das duas cultivares. Verifica-se que baixas concentrações de Mn, Ni e Cr estimulam o crescimento das plântulas de alface DP, sendo esta mais sensível à presença de Cu. Por outro lado, baixas concentrações de Zn e Mn promovem o crescimento da alface M4E, sendo esta menos tolerante à presença de Cd. O efeito da presença de elementos não essenciais pode ser classificado como:  $\text{Cd} > \text{Pb} > \text{Cr}$ , e para os elementos essenciais como:  $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Zn} > \text{Mn}$ .





## **Capítulo III – INFLUÊNCIA DOS EPTs NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS**

### **3.1. Objetivo**

Com este Capítulo pretende-se clarificar o modo como os EPTs afetam a germinação e o crescimento de plântulas de duas cultivares de alface.

Nos ensaios de germinação e desenvolvimento de plântulas de alface, aplicam-se separadamente diferentes concentrações de Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn ou Mn, pretendendo-se simular o efeito de meios contaminados na germinação numa fase inicial do desenvolvimento da plântula.

Com a realização destes ensaios pretende-se verificar se a taxa de germinação é influenciada pela presença destes elementos, analisar se existem efeitos visíveis de toxicidade, caracterizar a acumulação e tolerância das plântulas de alface, continuamente expostas a diferentes concentrações de EPTs, e analisar diferenças no comportamento das duas cultivares em estudo.

### **3.2. Introdução**

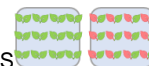
A germinação das sementes é um processo fisiológico das plantas que pode ser afetado pela contaminação por EPTs quando estes entram em contacto com o embrião. O efeito dos EPTs na semente depende da sua capacidade em penetrar o seu tegumento e alterar vários processos fisiológicos que estão envolvidos na germinação e que vão ser descritos posteriormente.

A realização de ensaios de germinação e de desenvolvimento de plântulas em estágios iniciais de crescimento são fundamentais (Bae et al., 2016; Sethy e Ghosh, 2013 ) uma vez que esta fase inicial irá determinar o crescimento vigoroso e o rendimento da planta adulta.

#### **3.2.1. Germinação e Emergência**

A germinação consiste na fase inicial de crescimento de uma planta a partir de uma semente, no seu estado latente (Nonogaki e Nonogaki, 2017; Nonogaki et al., 2010). O tempo de germinação corresponde ao tempo necessário para que o processo de germinação esteja completo, considerando o primeiro dia em que se coloca a semente. A taxa de germinação

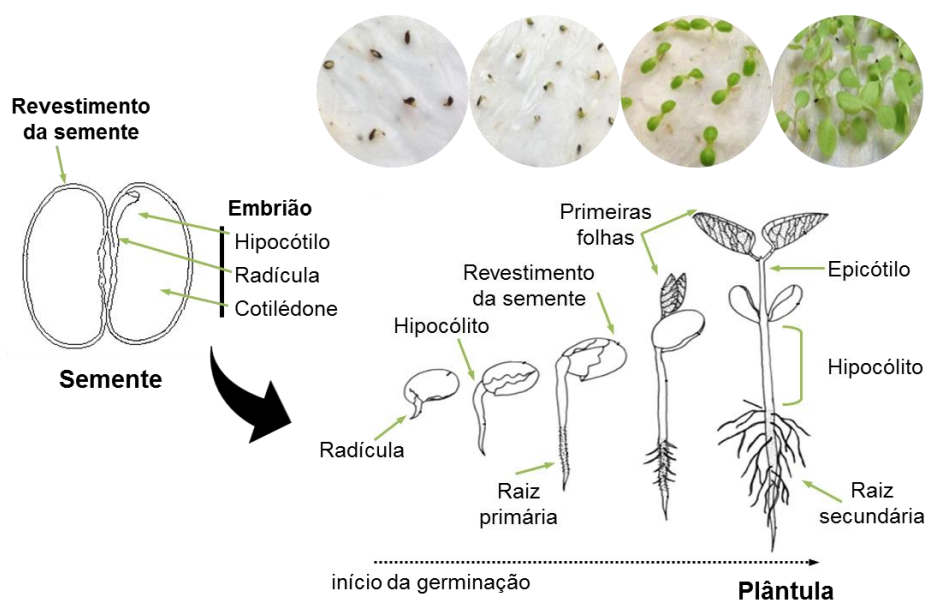




traduz-se na quantidade de sementes que germinam num dado período. É normalmente expressa em percentagem.

No caso da alface, o tempo de germinação são 2-3 dias até ocorrer a exposição da radícula. O propágulo da alface é um fruto seco, indeiscente, monospérmico, classificado como aquénio, designando-se agronomicamente por semente. As sementes apresentam uma capacidade germinativa mínima de 75 %, sendo 93-95 % para as cultivares comerciais (Almeida, 2006). A duração da faculdade germinativa é de 3 a 5 anos quando as sementes são conservadas em boas condições (em embalagens herméticas, à temperatura de 4 a 10 °C).

Na **Figura 3.1** encontra-se uma representação esquemática da germinação epígea característica da alface e a constituição da semente e da plântula.



**Figura 3.1** – Representação do processo germinativo da plântula de alface.

A semente é uma estrutura que permite a sobrevivência do embrião desde a maturação da semente até à germinação, iniciando uma nova geração. A formação da semente completa o processo de reprodução da planta.

As sementes de angiospérmicas são constituídas pelo embrião (eixo embrionário, com dois cotilédones), pelo tegumento da semente (tegumento e pericarpo), e pelo tecido de reserva (endosperma), que às vezes pode estar ausente. A sua maturação inclui a formação do embrião, através de divisão celular ou diferenciação, e de reservas de nutrientes. A semente adquire também a capacidade de tolerância à dessecação e dormência.



Os tecidos de reserva da semente são o endosperma e os cotilédones. O endosperma encontra-se aderido à epiderme interna do tegumento e é a primeira fonte de reservas. Durante a germinação, as reservas presentes nos cotilédones só são mobilizadas após serem utilizadas todas as reservas do endosperma. O tegumento da semente, estrutura protetora ou “casca” é constituído pelo tegumento, e algumas vezes, também pelo pericarpo.

A designação plântula refere-se a uma planta jovem que se desenvolveu a partir do embrião. O embrião é constituído pela radícula (raiz embrionária), o hipocótilo (caule embrionário) e os cotilédones (folhas provenientes da semente).

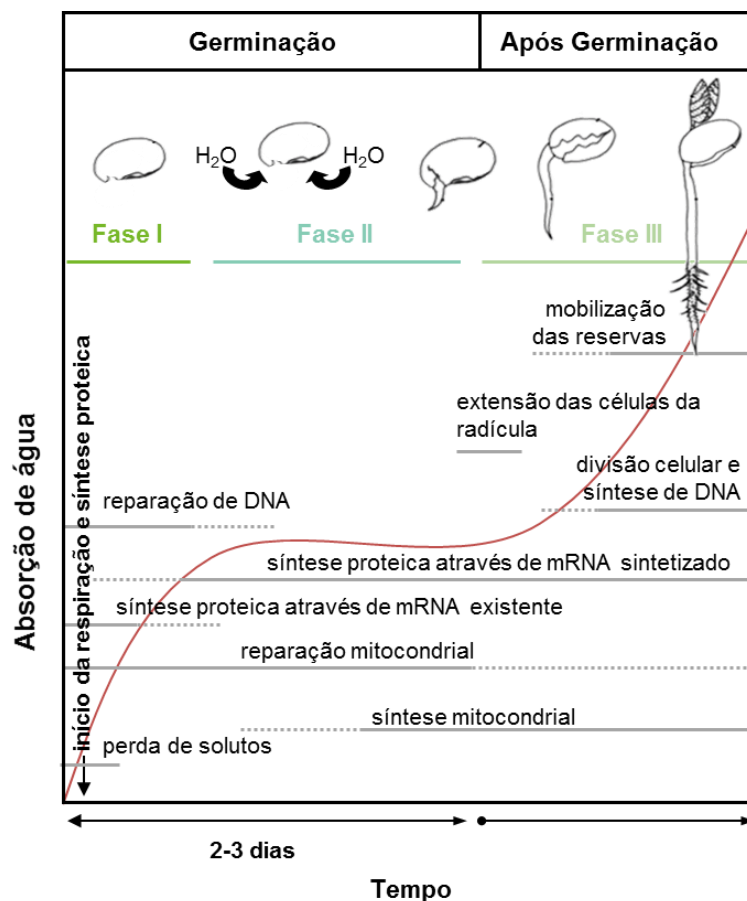
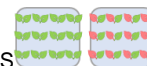
### 3.2.2. Etapas da Germinação

A germinação inicia-se com a absorção de água pela semente, processo designado por embebição, e que favorece o crescimento do embrião. Após este processo há a emergência e crescimento da radícula, que penetra a estrutura que reveste o embrião, e que marca o fim da germinação e início do crescimento da jovem plântula (Bewley, 1997).

As etapas da germinação compreendem a embebição, ativação do metabolismo e extensão da radícula.

Na embebição, a presença de água na germinação é fundamental dado que a semente necessita de água suficiente para ficar humedecida, mas não submersa. Esta absorção faz com que o embrião inche favorecendo o rompimento do tegumento da semente. A taxa de embebição depende da permeabilidade do tegumento da semente, da quantidade de água disponível e da área de contacto entre a semente e o meio envolvente (Hegarty, 1978).

Segundo Bewley (1997) a absorção de água pela semente compreende três fases: iniciando-se com uma rápida absorção inicial (fase I), seguida de uma fase estacionária (fase II) e uma fase III que se caracteriza por um aumento adicional na absorção de água que apenas ocorre após a germinação estar completa. As sementes em dormência não entram na fase III porque não completam o processo de germinação (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2** – Evolução das principais alterações metabólicas que ocorrem ao longo das diferentes fases da embebição. Fonte: adaptado de Bewley (1997) e Nonogakia et al. (2010).

A entrada de água para as células da semente intacta resulta numa perturbação temporária da sua estrutura, particularmente nas membranas, levando a uma rápida perda de solutos e metabolitos de baixo peso molecular para a solução de embebição envolvente. Num curto espaço de tempo de reidratação, as membranas voltam à sua configuração estável, e ocorre a diminuição da perda de solutos (Sandoval et al., 1995). Como consequência da embebição, a semente rapidamente reinicia a atividade metabólica.

Na semente encontram-se armazenadas substâncias de reserva energética como glúcidos (amido), proteínas e lípidos, que são necessários nesta fase inicial. Uma das primeiras alterações da germinação, devido à embebição, é o início da atividade respiratória (Bewley, 1997). Quando a semente absorve água, ocorre a ativação das enzimas hidrolíticas, para que ocorra a hidrólise destas macromoléculas e ativação do metabolismo, com a consequente produção de energia (catabolismo) e síntese de compostos (anabolismo).



A mobilização da maior parte das reservas armazenadas, está associada ao crescimento da plântula jovem. Quando se inicia a extensão da raiz e o desenvolvimento das primeiras folhas, as reservas energéticas disponíveis na semente esgotam-se, e nesta fase, a fotossíntese vai fornecer a energia necessária para a plântula continuar o seu crescimento.

O tegumento da semente protege o embrião contribuindo para a resistência a stresses bióticos e abióticos, e determina as condições ótimas ambientais para a viabilidade e crescimento da próxima geração.

A extensão da radícula através do tegumento da semente é o que determina o final da germinação e o início do crescimento da plântula. Em várias sementes, o tegumento da semente divide-se durante a embebição e é apenas a rigidez das células da radícula que determina o seu crescimento. Para a protrusão da radícula ocorre um enfraquecimento dessa estrutura que envolve a degradação parcial enzimática das paredes das células através de hidrolases específicas produzidas pelo endosperma.

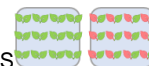
No caso da alface, o potencial osmótico não é suficiente para permitir a extensão e existe restrição no crescimento da radícula imposta pelas estruturas envolventes, como o endosperma. Na alface, sob o pericarpo do aquénio há 2 a 3 camadas de células que constituem o endosperma da semente. O endosperma degrada-se durante a germinação e as suas reservas lipídicas são utilizadas para o desenvolvimento do embrião (Almeida, 2006).

### **3.2.3. Efeitos fisiológicos na germinação das sementes e no crescimento das plântulas**

Dada a efetiva presença de poluentes no meio ambiente, o estudo da forma como a planta se comporta num meio contaminado, com concentrações crescentes de EPTs, nesta fase inicial de crescimento é fundamental, para compreender o efeito tóxico destes contaminantes na tolerância da plântula.

#### **3.2.3.1. Estimulação da germinação por baixas concentrações de EPTs**

O processo de germinação é rigorosamente controlado pelas condições ambientais, sendo provável que os fatores externos controlem o equilíbrio entre a produção e sequestração das espécies reativas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species*, ROS) nas células. Este equilíbrio é benéfico para a germinação, particularmente como um sinal positivo para a diminuição da dormência das sementes ou poderá ter um efeito negativo, com a consequente produção excessiva das ROS que causa stresse oxidativo.



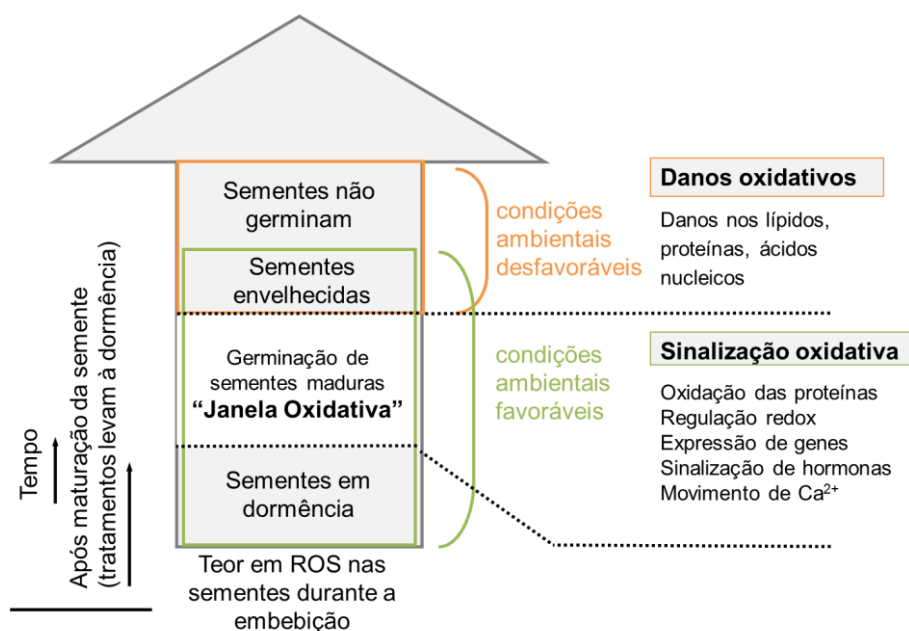
As ROS são continuamente produzidas durante o desenvolvimento da semente, desde a embriogênese até à germinação, bem como durante a armazenagem de reservas na semente. Estas espécies têm uma dupla função no comportamento da fisiologia da semente: são moléculas de vias de sinalização celular e são produtos tóxicos que se acumulam em condições de stresse (Bailly et al., 2008).

Bae et al. (2016) referiram que baixos níveis de Pb e Ni ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) promoveram a germinação de *Ambrosia Artemisiifolia*. Lefèvre et al. (2009) e Kjær et al. (Kjær et al., 1998) também verificaram que concentrações baixas de Cd ( $1 \text{ }\mu\text{M}$ ) e Cu ( $232 \text{ mg kg}^{-1}$ ) originaram uma ligeira estimulação da germinação de *Dorycnium pentaphyllum* e *Fallopia convolvulus*, respetivamente. Isto pode ser atribuído a um aumento de produção de ROS e de espécies reativas de azoto (*Reactive Nitrogen Species*, RNS), como o óxido nítrico (NO), em plantas expostas a estes elementos. O resultado foi um ligeiro aumento do nível de stresse oxidativo que estimulou a germinação. Isto está de acordo com o referido por Bailly et al. (2008) como a “janela oxidativa”, ou seja, a necessidade de uma concentração estritamente regulada de ROS que é essencial para a germinação.

A “janela oxidativa” é um modelo que explica o duplo papel das ROS na fisiologia das sementes (**Figura 3.3**). A germinação só é possível quando o teor de ROS se encontra na janela oxidativa. Nas sementes em estado de dormência, a quantidade de ROS durante a embebição é muito baixa para permitir a germinação. Após a maturação da semente, há um aumento do nível celular de ROS durante a embebição da semente, garantindo assim, a germinação completa, devido ao papel de sinalização das ROS.

Quando as sementes estão envelhecidas ou colocadas em condições ambientais não adequadas, durante a embebição, estes estímulos ambientais são detetados pelas ROS e o seu teor é muito elevado. Neste caso, as ROS tornam-se prejudiciais e causam danos oxidativos que previnem ou retardam a germinação.

Sob condições de stresse, como a presença de EPTs, a formação das ROS excede a capacidade de sequestração da defesa antioxidante. O equilíbrio na homeostase de ROS permite prevenir os danos oxidativos nos lípidos, proteínas e ácidos nucleicos resultantes de uma acumulação incontrolada de ROS que pode ocorrer durante o envelhecimento ou dessecação das sementes. No caso das sementes, as ROS podem reagir com os ácidos nucleicos, afetando o código genético do embrião, e com as reservas da semente como as proteínas e lípidos, comprometendo a germinação e o desenvolvimento da plântula com potenciais efeitos mutagénicos na próxima geração (Bailly et al., 2008).



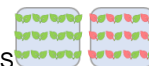
**Figura 3.3** – Representação esquemática do efeito dos ROS nas sementes durante a embebição. Fonte: adaptado de Bailly et al. (2008).

Bailly et al. (2008) propõem que as alterações na homeostase das ROS poderiam ter uma função na percepção dos fatores ambientais pela semente durante o processo germinativo e, assim atuar como um sinal de controlo para se completar a germinação. Deste modo, baixas concentrações de EPTs estimulam ligeiramente o crescimento das plântulas, devido à estimulação da atividade do ciclo celular através do aumento da sinalização das ROS (Gapper e Dolan, 2006). Peralta et al. (2001) também referiram que baixas concentrações de Cd, Cr, Cu, Ni e Zn estimularam o crescimento da raiz. Contudo, elevadas concentrações de EPTs, causam stresse oxidativo, têm impacto negativo na TG e, eventualmente, podem levar à inviabilidade das sementes.

### 3.2.3.2. Efeito dos EPTs na germinação e no crescimento das plântulas

A germinação é o primeiro passo da vida de uma planta e a diminuição da taxa de germinação parece ser o primeiro efeito resultante de condições ambientais adversas. De um modo geral, concentrações crescentes de EPTs levam a uma diminuição na TG (Lamhamdi et al., 2011; Zhang et al., 2008). A germinação é influenciada pela presença de EPTs devido (i) à sua toxicidade e (ii) através do seu efeito na inibição da absorção de água, na fase de embebição.

Para uma semente germinar, o potencial hídrico do embrião precisa passar um limiar crítico descrito anteriormente em 3.2.2. O potencial hídrico da semente está relacionado com as



alterações na taxa de germinação e na velocidade da germinação. Alguns EPTs, como o Cd e Cu, interferem na absorção de água pela semente.

O efeito tóxico dos EPTs ocorre quando existe um contacto direto com a plântula em desenvolvimento, após a protusão da radícula. Antes da germinação, o embrião não contacta diretamente com o elemento devido à existência da película protetora que previne a acumulação de uma quantidade tóxica de EPTs na semente (Bautista et al., 2013; Kranner e Colville, 2011).

Em muitas espécies, o tegumento da semente é uma importante defesa da planta contra stresses abióticos, suportando a ideia que a semente representa uma parte protegida do ciclo de vida de uma planta (Kranner e Colville, 2011). Esta estrutura externa da maior parte das sementes é a principal barreira à entrada de EPTs e previne a contaminação dos embriões até à exposição da radícula. Há plantas em que a taxa de germinação não é afetada, uma vez que os EPTs podem ser adsorvidos pelo tegumento da semente, não atingindo o embrião (Di Salvatore et al., 2008). No entanto, ao longo do tempo não se obtêm plântulas viáveis, podendo isso ser observado, por exemplo, pelo comprimento da radícula (Li et al., 2005).

Há uma grande variação na morfologia e na permeabilidade do tegumento das sementes, nomeadamente, existem sementes com tegumentos de permeabilidade variável, desde muito permeáveis a semipermeáveis e impermeáveis, dependendo das características físicas e químicas dos EPTs (Moïse et al., 2005). Seregin e Kozhevnikova (2005) estudaram a permeabilidade do tegumento da semente ao Cd, Pb e Ni, analisando a sua distribuição na semente, e verificaram que o Cd e o Pb estavam restringidos às células do tegumento, enquanto que o Ni foi translocado através do tegumento.

As etapas de germinação das sementes e o crescimento das plântulas são muito sensíveis à presença de Cd e a sua influência no processo germinativo tem sido referida na bibliografia (Di Salvatore et al., 2008; Farouk et al., 2011; Liu et al., 2007; Rady, 2011; Rahoui et al., 2010; Shekar et al., 2011; Srivastava et al., 2014). Quando o meio de germinação está contaminado com Cd, pode ocorrer a inibição da absorção de água e restrição do movimento de água dentro do embrião (Liu et al., 2012; Vijayaragavan et al., 2011), sendo considerada a principal causa para a diminuição da taxa de germinação (Bautista et al., 2013; Kranner e Colville, 2011), atraso na germinação e alterações no desenvolvimento das plântulas (Kabir et al., 2008; Shafiq et al., 2008). O Cd, tem sido referido por ter influência no processo de embebição (Kranner e Colville, 2011), nomeadamente na absorção de água e na mobilização das reservas para a semente. Lefèvre et al. (2009) verificaram que o Cd inibiu a embebição e





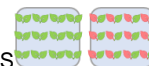
diminuiu o teor em água das plântulas *Dorycnium pentaphyllum*. A inibição da germinação induzida pelo Cd foi revertida após a lavagem das sementes, tal como verificado por Siddiqui et al. (2014), para sementes expostas a Cd, Cr e Pb. Uma possível explicação pode ser devido ao facto de as sementes não conseguirem absorver água suficiente quando foram expostas aos EPTs, em vez de existir uma toxicidade propriamente dita. A diminuição da absorção de água também foi referida em sementes de ervilha expostas a Cd (Siddiqui et al., 2009).

Os efeitos tóxicos induzidos pela presença de Cr incluem alterações no processo germinativo, como a diminuição da germinação (Andaleeb et al., 2008; Bautista et al., 2013), ou em afetar o crescimento da radícula e de folhas jovens (Scoccianti et al., 2006), com consequências no crescimento da plântula (Santos e Rodriguez, 2012; Shanker et al., 2005). Segundo Zeid (2001), durante a germinação na presença de Cr, ocorre uma diminuição na atividade enzimática da  $\alpha$  e  $\beta$ -amilase, que é um dos principais fatores para a inibição do processo germinativo, tendo impacto negativo no fornecimento de nutrientes ao embrião em desenvolvimento.

O Pb não atua através da inibição do processo de embebição, tal como acontece com o Cd e Cu. A permeabilidade do tegumento é seletiva ao Pb e varia durante a absorção de água. A maior parte das plantas tem tegumentos impermeáveis, pelo que o Pb não tem a capacidade em penetrar o tegumento da semente ficando o embrião protegido do seu efeito tóxico (Wierzbicka e Obidzińska, 1998). O tegumento é impermeável ao Pb na fase I, quando existe uma intensa absorção de água. Nas fases finais, os tegumentos ficam mais permeáveis ao Pb, tendo influência direta na germinação. É dessa forma que se verifica o efeito inibitório do Pb na germinação das sementes, bem como na diminuição da taxa de germinação, comprimento da raiz e parte aérea, massa seca das raízes e parte aérea e no crescimento das plântulas (Kabir et al., 2008; Kiran, 2005; Lamhamdi et al., 2011; Lamhamdi et al., 2013; Pourrut et al., 2011; Shafiq et al., 2008; Srivastava et al., 2014). A presença de Pb também retarda o desenvolvimento da semente diminuindo a emergência da radícula através da diminuição da atividade das amilases (Singh et al., 2011). Os sintomas visíveis devido à presença de um excesso de Pb são uma rápida inibição do crescimento da raiz, aparecimento de cloroses nas folhas e crescimento atrofiado da planta (Sharma e Dubey, 2005).

O Cu pode influenciar todos os estágios de vida de uma planta por ser um elemento essencial. O efeito deste elemento na germinação das sementes tem sido referido por vários autores (Li et al., 2005; Muccifora, 2013; Ozdener e Kutbay, 2009; Peralta et al., 2001; Singh et al., 2007; Zhang et al., 2008). Em arroz, o Cd e Cu afetaram maioritariamente o crescimento da raiz, seguindo-se o crescimento da parte aérea e, por fim, a germinação que só foi afetada para





elevadas concentrações (Ahsan et al., 2007b; Ahsan et al., 2007a). O Cu tem sido referido por influenciar o processo de embebição, tal como o Cd. Num estudo realizado por Li et al. (2005), os efeitos tóxicos de Cu na germinação de sementes de *Arabidopsis* foram reversíveis após a lavagem das sementes.

O Ni tem sido referido como tóxico para a maior parte das plântulas, afetando a germinação das sementes, através da atividade enzimática das amilases e proteases que tem como consequência um atraso nesse processo, e no crescimento das plântulas, tendo como consequência a diminuição do rendimento (Ahmad e Ashraf, 2011; Di Salvatore et al., 2008; Maheshwari e Dubey, 2009; Peralta et al., 2001; Yusuf et al., 2011). A presença de Ni afeta a digestão e mobilização das reservas das sementes, como glúcidos e proteínas (Ashraf et al., 2011) levando a uma diminuição do tamanho das plântulas, comprimento da raiz, massa fresca e seca, e teor de clorofila. A exposição de duas variedades de arroz, a 200 e 400  $\mu\text{M}$  de Ni resultou numa acumulação deste elemento no embrião durante a embebição, causando uma diminuição na TG, diminuição do comprimento da raiz e parte aérea, e consequente diminuição da biomassa das plântulas (Maheshwari e Dubey, 2009).

O Zn é considerado o menos tóxico dos EPTs, tendo sido referido como o elemento com menos impacto na germinação (Munzuroglu, 2002; Peralta et al., 2001). Também têm sido realizados vários estudos sobre a influência da presença de Zn na germinação e desenvolvimento de plântulas. Beyer et al. (2013); Bityutskii (2002) e Marichali et al. (2014) referem que o Zn não afetou o processo germinativo mas diminuiu o tamanho da radícula das plântulas de coentros. Lefèvre et al. (2009) referiram que o Zn não afetou a embebição de sementes de *Dorycnium pentaphyllum* num meio com elevada concentração de Zn e as sementes não germinaram após serem lavadas com água desionizada. Os autores inferiram que o Zn induziu a inibição da germinação através do seu efeito tóxico, quando as sementes iniciaram a germinação.

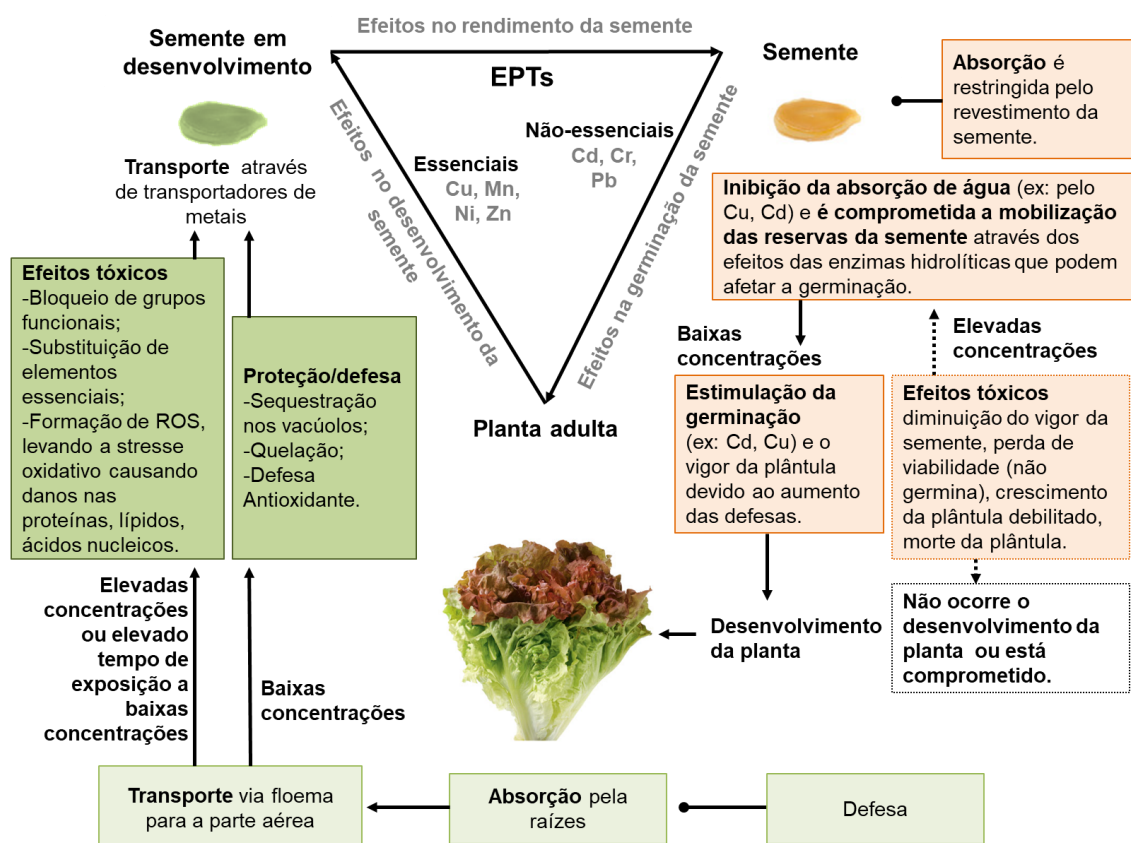
O efeito fitotóxico do Mn e a tolerância das plântulas face a este elemento nesta fase inicial de desenvolvimento tem sido referido por alguns autores (Bityutskii, 2002; Moroni et al., 2013). Beyer et al. (2013) observaram sintomas fitotóxicos resultantes da presença de Mn em soja, como o aparecimento de manchas castanhas nas folhas, cloroses e folhas enrugadas.

Estes estudos refletem as variações que existem na germinação e crescimento de plântulas em resposta ao stresse induzido pelos EPTs. Os estudos disponíveis sugerem que existem duas tendências: (i) as sementes mais tolerantes podem germinar em meios com elevada concentração de elemento, e por outro lado, (ii) os elementos essenciais causam danos



apenas em elevadas concentrações. Regra geral, a presença de elementos, em quantidades tóxicas, afeta o posterior crescimento da plântula, como o aparecimento de sintomas visíveis de toxicidade, diminuição do crescimento da raiz jovem e da parte aérea da plântula, e consequente diminuição da biomassa.

Na **Figura 3.4** está uma representação esquemática que resume os efeitos dos EPTs no desenvolvimento da semente e o seu efeito na germinação da semente.

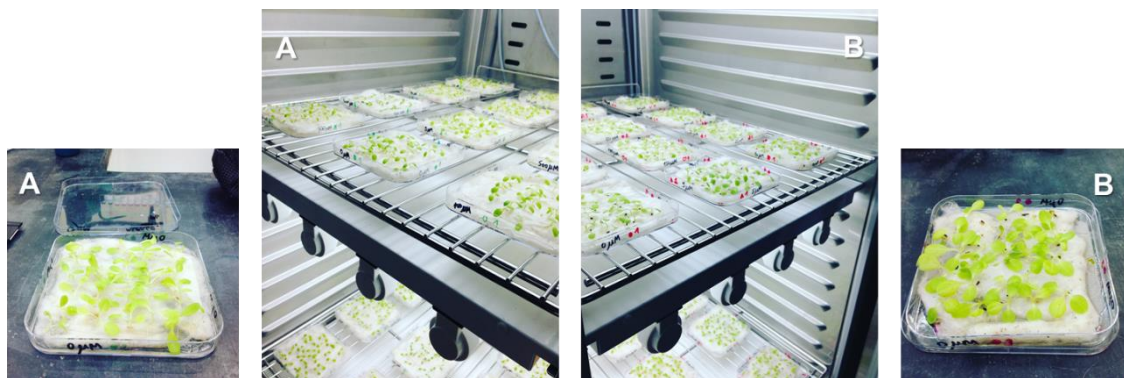
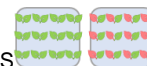


**Figura 3.4** – Representação esquemática do efeito dos EPTs nas sementes. Fonte: adaptado de Kranner e Colville (2011).

### 3.3. Material e Métodos

#### 3.3.1. Material Vegetal

Nestes ensaios foram utilizadas duas cultivares de alface DP e M4E (**Figura 3.5**) descritas no **Capítulo II (2.1.1.)**.



**Figura 3.5** – As duas cultivares de alface utilizadas nos ensaios de germinação e crescimento de plântulas. A - Alface Batavia Dourada da Primavera (DP); B - Alface Maravilha das Quatro Estações (M4E).

### 3.3.2. Delineamento experimental

Os ensaios de germinação e desenvolvimento teve 2 fases de produção de plântulas: 1ª fase de sementeira e germinação, com a exposição da radícula que ocorreu ao fim de 2 dias, e uma 2ª fase de crescimento das plântulas até 10 dias, contabilizados desde a sementeira. O delineamento experimental dos ensaios foi realizado como se esquematiza na **Figura 3.6**.

A metodologia adaptada para estes ensaios foi a referida por Ozdener e Kutbay (2009). As sementes foram semeadas, em placas de petri, com uma camada de algodão cardado coberto por papel de folha dupla.

Nestes ensaios utilizaram-se concentrações de EPTs semelhantes às que outros autores referiram (Kranner e Colville, 2011) e às que se encontram presentes na solução dos solos contaminados (Di Salvatore et al., 2008). Neste sentido, a preparação das soluções de contaminação, a partir de uma solução *stock* de contaminação (0,01 M), foi realizada com os sais descritos em **2.1.2. (Capítulo II)**, para o EPT aplicado (Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn ou Mn).

Para cada EPT utilizaram-se as seguintes concentrações: 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 250, 350, 500, 750 e 1000  $\mu\text{M}$ . No caso do Mn foram também utilizadas as concentrações de 2000, 5000 e 10000  $\mu\text{M}$ .

Os ensaios tiveram início com a adição das soluções com diferentes concentrações de EPT. Nos primeiros 2 dias, humedeceu-se o algodão cardado e o papel previamente preparados, apenas com água destilada no caso do controlo, e nas outras modalidades foram utilizadas as soluções de contaminação, previamente, preparadas em água desionizada.

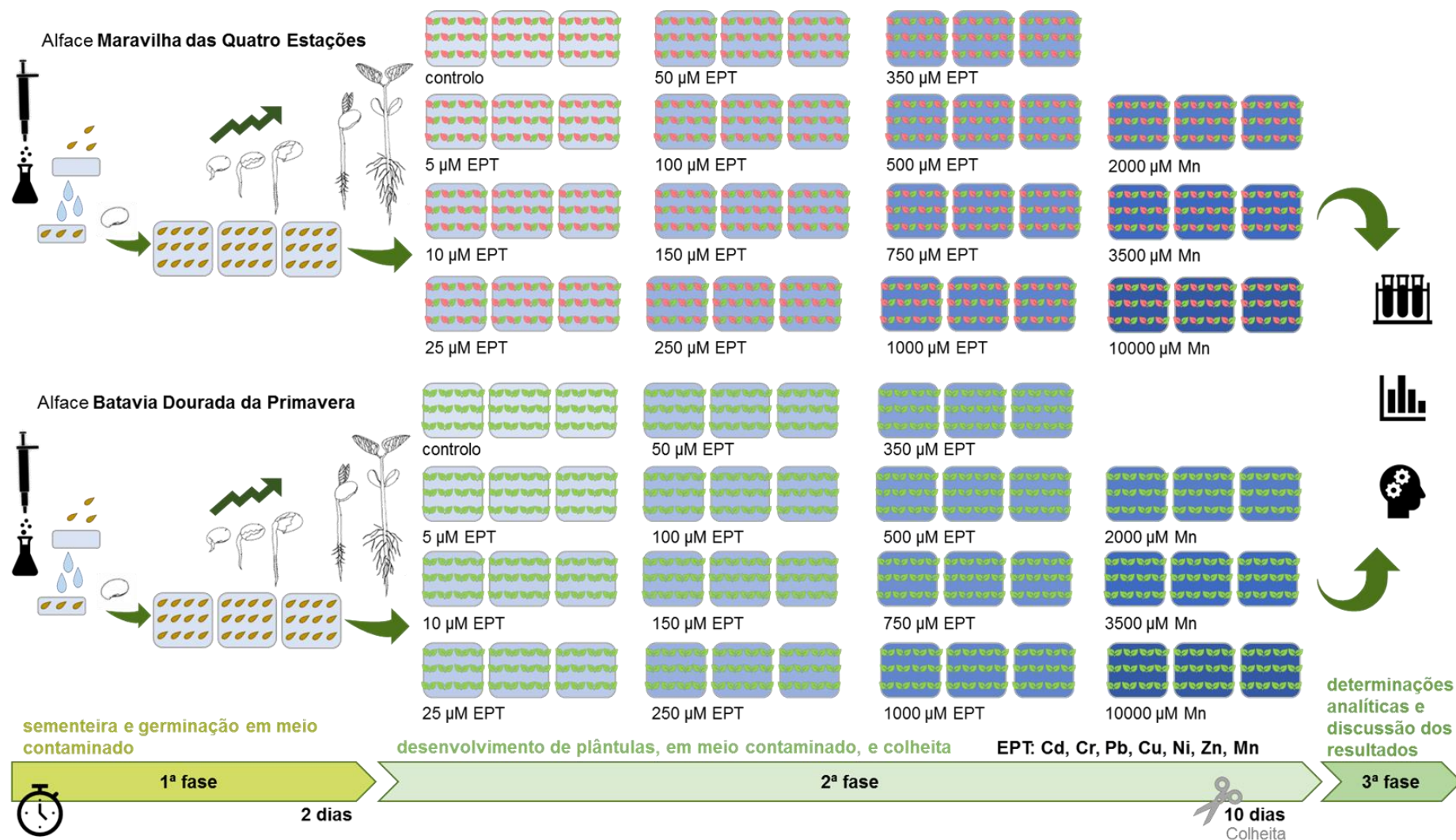
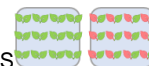


Figura 3.6 – Representação esquemática dos ensaios de germinação e desenvolvimento de plântulas.



Após a germinação, foi adicionada solução nutritiva de Hoagland a 10 % (2.1.2.) contaminada com o respectivo EPT. No controlo foi apenas adicionada solução nutritiva de Hoagland, a 10 % sem nenhum tipo de contaminante.

A adição de solução foi sempre contabilizada e realizada de modo a deixar o algodão cardado e o papel humedecidos, para garantir as condições ótimas para a germinação e o desenvolvimento das plântulas. A disposição das placas na câmara foi sempre feita de forma aleatória. Para cada placa de cada modalidade foram testadas 30 sementes, em triplicado, para cada uma das cultivares em estudo.

### 3.3.3. Instalação dos ensaios

Os ensaios decorreram numa câmara climatizada (*Aralab*) (Figura 3.7), no Horto de Química Agrícola do Instituto Superior de Agronomia, durante 2013 e 2014, de acordo com o cronograma apresentado na Tabela 3.1. As condições de crescimento das plântulas estão descritas em 2.1.3.

**Tabela 3.1** – Cronograma utilizado no delineamento experimental dos ensaios de germinação e desenvolvimento de plântulas.

Ano	Mês											
	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
2013										Cr	Cd	Pb
											Ni	Cu
2014												
	Zn	Mn										
	Mn											

Legenda:

	Cd		Pb
	Cu		Ni
	Zn		Cr
	Mn [elevadas]		Mn
	Determinações analíticas		
	Pb/Cr (ensaio prévio)		

Antes de se iniciar os ensaios definitivos foi necessário realizar um ensaio prévio que decorreu entre Junho/Julho de 2013. Este ensaio teve como objetivo a adequação do delineamento experimental ao tipo de ensaio e ao material vegetal a estudar, ponderando o desenvolvimento vegetativo das duas cultivares, e o tempo necessário para a obtenção dos materiais vegetais pretendidos.





**Figura 3.7** – Ensaio de germinação e crescimento de plântulas instalados, na câmara climatizada, no Horto de Química Agrícola. A-plântulas ao fim de 10 dias de crescimento; B-etapa de germinação; C-ensaio instalado; D-colheita das amostras; E-conservação do material vegetal.

### 3.3.4. Colheita, amostragem e conservação de amostras

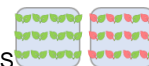
Ao fim de 10 dias de exposição ao stresse, realizou-se a colheita das plântulas. Na amostragem, cada amostra foi constituída por 20 plântulas, em triplicado, para cada modalidade do ensaio.

Na colheita separaram-se as diferentes partes da plântula, permitindo determinar o comprimento da raiz e a biomassa (massa fresca, MF) da parte aérea e da raiz. Foram também registados os efeitos visíveis de toxicidade no final de cada ensaio para cada uma das modalidades.

Nestes ensaios, como se tratam de plântulas, a metodologia aplicada teve algumas alterações da referida no **Capítulo II (2.2.1.)**. Todo o material vegetal foi lavado com água desionizada e seco na estufa a 60 °C, até massa constante (7 dias) para, posteriormente, se determinar o teor de matéria seca (MS). De seguida, as amostras secas foram moídas num almofariz, com pilão, e conservadas num local seco.

### 3.3.5. Determinações analíticas

Para se avaliar o efeito dos EPTs na germinação e no crescimento de plântulas de alface analisou-se a taxa de germinação e o número de plântulas viáveis ao longo do ensaio. Na colheita foi possível determinar o comprimento da raiz e a biomassa da parte aérea e da raiz. Após avaliar estes parâmetros denominados de vegetativos, calculou-se os índices de vigor das plântulas, de tolerância da raiz e de inibição, e nas determinações analíticas obteve-se o teor de EPT.



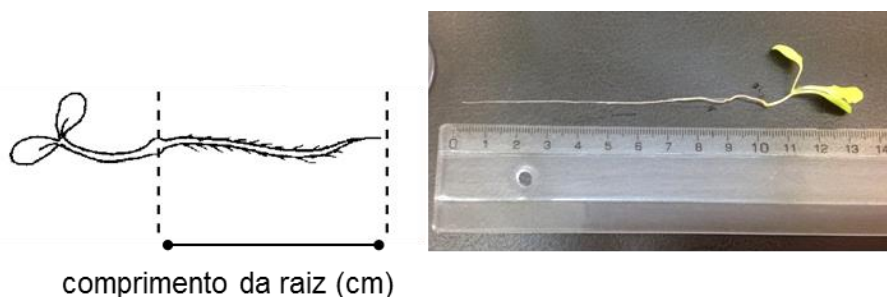
### 3.3.5.1. Determinação da taxa de germinação e número de plântulas viáveis

Para se determinar a TG procedeu-se à contagem do número de sementes germinadas, ao fim de 2 dias. Os resultados obtidos foram expressos em percentagem de sementes germinadas.

Ao fim de 6 dias foi também contabilizado o número de plântulas viáveis (PV), para assegurar que todas as plântulas já tinham um certo desenvolvimento inicial. Quando a concentração de um EPT se encontra em excesso, pode resultar numa germinação anormal, ou seja, o tegumento é rasgado pela radícula, mas não se verifica o seu desenvolvimento posterior. Isto poderá ser um indicador da sensibilidade da plântula jovem face ao EPT presente no meio (Munzuroglu, 2002). Entende-se por uma plântula viável aquela que apresenta um desenvolvimento “normal” dada a concentração do meio, ou seja, que sobreviveu apesar de poder apresentar sintomas de toxicidade.

### 3.3.5.2. Determinação da biomassa e comprimento da raiz

Após 10 dias, foi determinada a massa fresca, por plântula, da parte aérea e da raiz e medido o comprimento da raiz, tal como se exemplifica na **Figura 3.8**.



**Figura 3.8** – Exemplificação da medição do comprimento da raiz da plântula.

### 3.3.5.3. Índices de vigor das plântulas e de tolerância da raiz

Para se avaliar o efeito tóxico calculou-se os índices de vigor das plântulas e de tolerância. O Índice de Vigor das Plântulas (IVP) (Abdul-Baki e Anderson, 1973; Novo e González, 2014) foi calculado a partir da seguinte expressão:

$$\text{IVP} = \text{TG} \times \text{Lr}$$



em que,

TG é a taxa de germinação obtido para dada modalidade (%).

Lr é o comprimento médio da raiz obtido para determinada modalidade (cm).

O Índice de Tolerância da Raiz (ITR) foi calculado usando a seguinte fórmula (Rossato et al., 2011):

$$ITR = \frac{raiz_{EPT}}{raiz_{CT}} \times 100 (\%)$$

em que,

raiz<sub>EPT</sub> é o comprimento da raiz obtida em meio contaminado (cm).

raiz<sub>CT</sub> é o comprimento da raiz obtida em meio não contaminado (cm).

A análise destes índices foi feita por comparação do valor obtido para o controle (100 %), se for superior ocorreu um estímulo do parâmetro. Por outro lado, se for inferior ocorreu a diminuição da variável em estudo.

#### **3.3.5.4. Cálculo do índice de inibição**

Para se caracterizar o efeito dos EPTs nas variáveis em estudo (MF média da parte aérea e da raiz, e no comprimento da raiz), calculou-se o índice de inibição:

$$\text{Índice de inibição} = \frac{X_{CT} - X_{EPT}}{X_{CT}} \times 100 (\%)$$

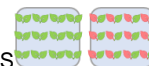
em que,

X<sub>EPT</sub> é o valor da variável (MF parte aérea, MF raiz ou comprimento da raiz) obtida na presença de contaminante.

X<sub>CT</sub> é o valor da variável (MF parte aérea, MF raiz ou comprimento da raiz) obtida em condições equivalentes em meio não contaminado.

Este índice pode ser inferior a 0 (valor atribuído à amostra controle), indicando que há uma atenuação da severidade, ou seja, um estímulo da variável em estudo. Se for superior há um aumento da severidade, logo, uma inibição do crescimento de dada variável. Através deste parâmetro será possível avaliar a concentração de EPT que causa uma inibição da variável em estudo, relativamente ao controle, em termos percentuais.





### 3.3.5.5. Determinação da concentração de elementos químicos

A determinação da concentração de elementos químicos foi apenas realizada na parte aérea das plântulas. Nesta metodologia é primeiro realizada uma digestão ácida (2.3.1.1.) e, posteriormente, a determinação e quantificação dos EPT por espectrofotometria de absorção atômica (2.3.1.2.).

Na digestão ácida a quantidade de amostra foi pesada, em função da quantidade de MS de cada modalidade. Adicionou-se, a cada tubo, 5 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), a 65 %, e 1 mL de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ), a 37 %. Quando a digestão terminou, o conteúdo dos tubos foi transferido para balões volumétricos de 10 mL, perfazendo-se o volume com água desionizada. Os elementos foram quantificados por EAA. As condições experimentais utilizadas encontram-se descritas no **Anexo A** (nas **Tabelas A1 e A2**).

### 3.3.6. Tratamento estatístico

Para avaliar o efeito do fator concentração de EPT aplicado, nas diferentes variáveis em estudo, tais como a TG, o número de plântulas viáveis, a MF da parte aérea e da raiz, o comprimento da raiz e a acumulação de EPT, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) a um fator e comparação de médias através do teste de Tukey para um nível de significância de 5 %. Nas Figuras e Tabelas os asteriscos (\*) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) das diferentes modalidades em relação ao controle, ou seja, se existiram diferenças significativas das plântulas contaminadas em relação ao controle.

A análise multivariada foi realizada usando o programa R 1.0.136 (*RStudio, Inc.*). A Análise em Componentes Principais (ACP) (*Principal Component Analysis, PCA*) permitiu avaliar a forma como estão relacionadas as variáveis em estudo. Os dados tiveram de ser normalizados, ou seja, a média igual a 0 e a variância a 1. Isto ocorreu porque a ordem de grandeza das variáveis é diferente, por exemplo os valores da quantidade EPT que é absorvido pela parte aérea das plântulas de alface apresentou uma ordem de grandeza bastante superior quando comparado com os valores obtidos para a biomassa da raiz, e isso iria afetar a projeção nas componentes.

A ACP foi, então, realizada baseada na matriz de correlação entre 6 variáveis normalizadas: *bioshoot* (biomassa da parte aérea ou MF da parte aérea por plântula, g), *bioroot* (biomassa da raiz ou MF da raiz por plântula, g), *lengthroot* (comprimento da raiz, cm), *uptake* (quantidade de EPT que é absorvido pela parte aérea das plântulas de alface,  $\text{mg kg}^{-1}$ ), *TG*



(taxa de germinação, %) e *plantviav* (número de plântulas viáveis) para todos os indivíduos em estudo.

A análise de partição por *clusters* (*Partition Cluster Analysis, PAM*) foi realizada utilizando também a matriz de correlação com os dados das 6 variáveis normalizadas. A PAM foi realizada definindo-se previamente a formação de 3 *clusters* cujo objetivo foi minimizar a soma dos quadrados das distâncias a cada indivíduo em relação ao centróide da classe onde pertencia. Esta análise permitiu classificar em classes, distribuir e diferenciar os indivíduos, controle e contaminados, submetidos a diferentes concentrações de EPT.

### 3.4. Resultados e discussão

#### 3.4.1. Sintomas visíveis de toxicidade

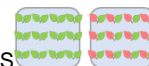
Nas plântulas de alface, os sintomas observados com a exposição a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn ou Mn são referidos na **Tabelas 3.2 a 3.8**, respetivamente.

Visualmente, o Cd é o EPT que mais afeta as plântulas de alface. Os principais sintomas observados são a diminuição do tamanho das plântulas, o aparecimento de folhas cloróticas e a redução e escurecimento das raízes, com a exposição a concentrações crescentes (**Tabela 3.2**).

Bautista et al. (2013) também verificaram que a aplicação de doses crescentes de Cd levou a uma diminuição visível no comprimento da raiz das plântulas de alface (cultivar batávia). Uma das alterações visíveis frequentes resultante de efeitos tóxicos é a diminuição do tamanho da folha, o que neste caso também foi observado nas plântulas de alface.

A diminuição da área foliar, bem como o aparecimento de cloroses e necroses são indicadores frequentes de toxicidade causada por EPTs, tal como referido por Nagajyoti et al. (2010). Yusuf et al. (2011) e Shanker et al. (2005) salientam que as características do crescimento da folha e o aparecimento de cloroses e necroses podem ser bioindicadores adequados para avaliar a contaminação por metais pesados e a seleção de espécies resistentes.

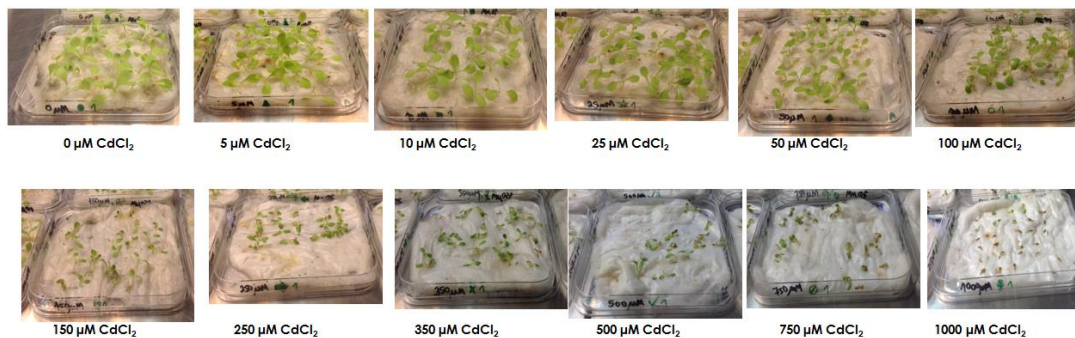
No caso do Cr (**Tabela 3.3**), não se verificam os sintomas observados para o Cd, ao nível de cloroses e acastanhamento das folhas, podendo-se inferir que este elemento apresenta menor toxicidade para as plântulas de alface.



**Tabela 3.2** – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Cd.

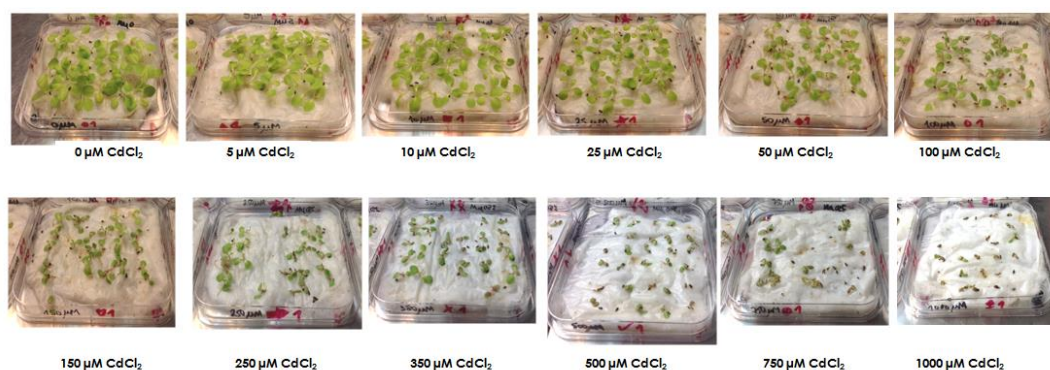
### Cádmio

#### DP



**Efeito visível do stresse: ≥50 µM de Cd**

#### M4E



**Efeito visível do stresse: ≥50 µM de Cd**

### PRINCIPAIS EFEITOS VISÍVEIS

(i) plântulas não viáveis e mortas nas concentrações mais elevadas.



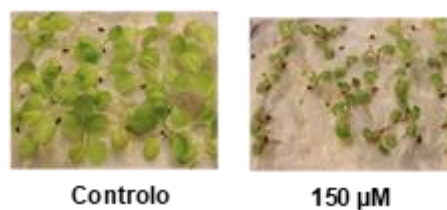
(ii) pontas das raízes castanhas e folhas cloróticas e acastanhadas.



(iii) decréscimo acentuado do comprimento da raiz e do tamanho das plântulas.



(iv) folhas mais pequenas e com coloração verde intensa.

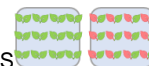




**Tabela 3.3** – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Cr.

Crômio	
DP	
Efeito visível do stresse: $\geq 250 \mu\text{M}$ de Cr	
M4E	
Efeito visível do stresse: $\geq 250 \mu\text{M}$ de Cr	
PRINCIPAIS EFEITOS VISÍVEIS	
(i) raízes mais pequenas, amareladas e finas na ponta.	(ii) diminuição do comprimento da raiz e do tamanho da plântula.
	Controlo      250 $\mu\text{M}$ 1000 $\mu\text{M}$
(iii) folhas mais pequenas e com verde mais intenso.	
Controlo	1000 $\mu\text{M}$





**Tabela 3.4** – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Pb.

## Chumbo

### DP

0  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     5  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     10  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     25  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     50  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     100  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$

150  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     250  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     350  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     500  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     750  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     1000  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$

**Efeito visível do stresse:  $\geq 250 \mu\text{M}$  de Pb**

### M4E

0  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     5  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     10  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     25  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     50  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     100  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$

150  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     250  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     350  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     500  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     750  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$     1000  $\mu\text{M Pb(NO}_3)_2$

**Efeito visível do stresse:  $\geq 250 \mu\text{M}$  de Pb**

### PRINCIPAIS EFEITOS VISÍVEIS

(i) redução do tamanho das folhas e o aparecimento de uma coloração verde intensa na folha.




























Controlo    250  $\mu\text{M}$     750  $\mu\text{M}$

(ii) diminuição do comprimento da raiz e redução do tamanho da plântula.

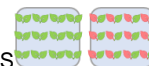
Controlo    250  $\mu\text{M}$     1000  $\mu\text{M}$



**Tabela 3.5** – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Cu.

Cobre					
DP					
					
0 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	5 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	10 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	25 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	50 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	100 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$
					
150 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	250 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	350 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	750 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	1000 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$
Efeito visível do stresse: $\geq 50 \mu\text{M}$ de Cu					
M4E					
					
0 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	5 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	10 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	25 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	50 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	100 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$
					
150 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	250 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	350 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	500 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	750 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$	1000 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$
Efeito visível do stresse: $\geq 50 \mu\text{M}$ de Cu					
PRINCIPAIS EFEITOS VISÍVEIS					
(i) diminuição acentuada do comprimento da raiz e seu escurecimento.			(ii) as folhas adquiriram uma coloração verde intensa e há diminuição do tamanho da folha.		
					
Controlo      1000 $\mu\text{M}$			Controlo      50 $\mu\text{M}$ 1000 $\mu\text{M}$		
(iii) aparecimento de folhas cloróticas.			(iv) plântulas não viáveis e mortas nas concentrações mais elevadas.		
					
250 $\mu\text{M}$					

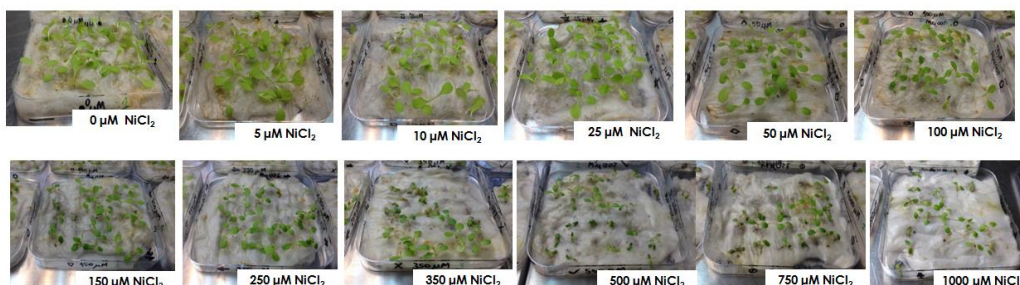




**Tabela 3.6** – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Ni.

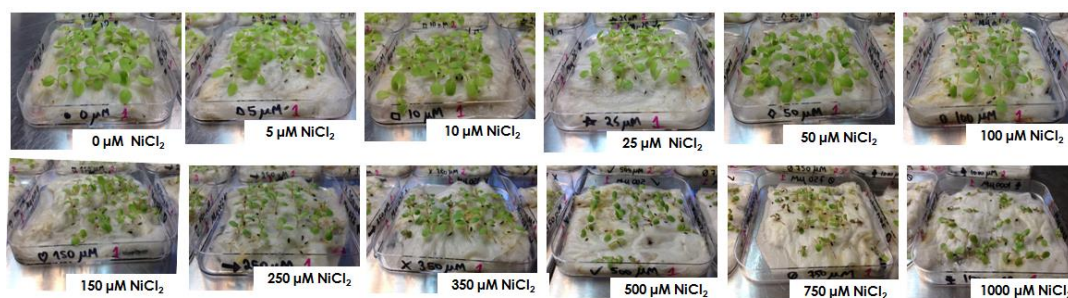
### Níquel

#### DP



**Efeito visível do stresse:  $\geq 100 \mu\text{M}$  de Ni**

#### M4E



**Efeito visível do stresse:  $\geq 150 \mu\text{M}$  de Ni**

### PRINCIPAIS EFEITOS VISÍVEIS

(i) diminuição do comprimento da raiz.



Controlo

100  $\mu\text{M}$

750  $\mu\text{M}$

(iii) aparecimento de uma raiz de coloração amarelada que afunila numa ponta castanha (nas concentrações mais altas).

(iv) diminuição do tamanho da folha e redução do crescimento da raiz.

(ii) redução do tamanho das plântulas e plântulas mortas e murchas com a exposição a 1000  $\mu\text{M}$ .



Controlo



150  $\mu\text{M}$



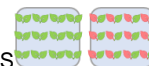
1000  $\mu\text{M}$



**Tabela 3.7** – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Zn.

Zinco											
DP											
0 $\mu\text{M ZnSO}_4$	5 $\mu\text{M ZnSO}_4$	10 $\mu\text{M ZnSO}_4$	25 $\mu\text{M ZnSO}_4$	50 $\mu\text{M ZnSO}_4$	100 $\mu\text{M ZnSO}_4$	150 $\mu\text{M ZnSO}_4$	250 $\mu\text{M ZnSO}_4$	350 $\mu\text{M ZnSO}_4$	500 $\mu\text{M ZnSO}_4$	750 $\mu\text{M ZnSO}_4$	1000 $\mu\text{M ZnSO}_4$
Efeito visível do stresse: $\geq 100 \mu\text{M}$ de Zn											
M4E											
0 $\mu\text{M ZnSO}_4$	5 $\mu\text{M ZnSO}_4$	10 $\mu\text{M ZnSO}_4$	25 $\mu\text{M ZnSO}_4$	50 $\mu\text{M ZnSO}_4$	100 $\mu\text{M ZnSO}_4$	150 $\mu\text{M ZnSO}_4$	250 $\mu\text{M ZnSO}_4$	350 $\mu\text{M ZnSO}_4$	500 $\mu\text{M ZnSO}_4$	750 $\mu\text{M ZnSO}_4$	1000 $\mu\text{M ZnSO}_4$
Efeito visível do stresse: $\geq 100 \mu\text{M}$ de Zn											
PRINCIPAIS EFEITOS VISÍVEIS											
(i) diminuição do tamanho das folhas e folhas com coloração verde mais intensa.						(ii) amarelecimento e redução acentuada do comprimento da raiz.					
Controlo	100 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$	Controlo			1000 $\mu\text{M}$					





**Tabela 3.8** – Principais sintomas visíveis observados nas duas cultivares de alface, ao fim de 10 dias de exposição a diferentes concentrações de Mn.

Manganês	
DP	
Efeito visível do stresse: $\geq 1000 \mu\text{M}$ de Mn	
M4E	
Efeito visível do stresse: $\geq 1000 \mu\text{M}$ de Mn	
PRINCIPAIS EFEITOS VISÍVEIS	
(i) diminuição gradual do tamanho das folhas.	(ii) redução do comprimento da raiz e estímulo do seu crescimento de 5 a 250 $\mu\text{M}$ .
(iii) a partir de 500 $\mu\text{M}$ , a primeira folha apareceu clorótica e mais pequena, e nas concentrações mais elevadas já não ocorreu a sua formação.	folhas cloróticas
	1ª folha

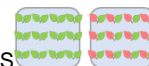


Scoccianti et al. (2006) verificaram que a presença de Cr levou a alterações no crescimento e desenvolvimento normal de plântulas de aipo, nomeadamente uma diminuição do tamanho das folhas e do comprimento da raiz, com o aumento da concentração deste EPT, tal como se verifica nas plântulas de alface. Singh (2001) também referiu que a aplicação de Cr, em concentrações  $\geq 60 \text{ mg kg}^{-1}$ , diminuiu o tamanho das folhas das plântulas de espinafre, reduzindo a sua taxa de crescimento.

Os sintomas visíveis da toxicidade por exposição ao Pb, nas plântulas de alface (**Tabela 3.4**), são muito semelhantes aos observados com o Cr. Lamhamdi et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo, observando que ocorreu uma diminuição significativa do crescimento das folhas e das raízes, nas plântulas de trigo, expostas a concentrações crescentes de Pb.

As plântulas de alface expostas a concentrações crescentes de Cu manifestam sintomas visíveis muito semelhantes aos observados para o Cd (**Tabela 3.5**). Neste caso particular, as raízes das plântulas de alface apresentam escurecimento, mais grossas, enroladas, quebradiças, com crescimento atrofiado e com numerosas raízes laterais pequenas. Estas alterações são mais intensas para concentrações mais elevadas de Cu. Este escurecimento da raiz também foi observado por Gajewska e Sklodowska (2010) em plântulas de trigo expostas a  $75 \mu\text{M}$  de Cu e por Mahmood et al. (2005) em plântulas de milho para  $47\text{-}189 \mu\text{M}$  de Cu. Yruela (2005) referiu que as plantas, quando crescem em meios contaminados com elevada quantidade de Cu manifestam uma diminuição da biomassa e ocorre o aparecimento de cloroses, tal como se verifica no presente estudo com as plântulas de alface. De acordo com Reichman (2002), quantidades tóxicas de Cu resultam em radículas pequenas, necróticas e podem apresentar deposição de fungos.

O Ni provoca menos danos visíveis nas plântulas de alface (**Tabela 3.6**), comparativamente ao Cu. Os sintomas observados, devido à exposição a concentrações crescentes de Ni, são a diminuição do crescimento das plântulas, o aparecimento de folhas murchas e o escurecimento da raiz. Este último sintoma só é visível para concentrações superiores a  $100\text{-}150 \mu\text{M}$ . Sintomas semelhantes aos verificados para o Ni também foram observados por Boominathan e Doran (2002) em plântulas de tabaco, ao fim de 7-10 dias de exposição a  $430 \mu\text{M}$  de Ni e por Pandey e Sharma (2002) que verificaram que a presença de  $500 \mu\text{M}$  de Ni resultou no aparecimento de folhas murchas em plantas *Brassica oleracea*, tal como se verifica no presente estudo com as plântulas de alface.



Nas plântulas expostas a Zn ocorre o aparecimento de folhas mais pequenas e amarelecimento e diminuição do tamanho das raízes. Resultados semelhantes foram observados por Reichman (2002). O autor também referiu que o primeiro sintoma de toxicidade causada pela presença de Zn foi o aparecimento de cloroses na primeira folha. Dependendo do nível de toxicidade, a clorose pode evoluir para uma tonalidade vermelha, devido à produção de antocianinas. No caso das plântulas de alface deste estudo, não se observam estes sintomas, para a gama de concentrações testada, podendo evidenciar uma certa tolerância a este EPT (**Tabela 3.7**).

Em relação ao Mn verifica-se um menor efeito tóxico, tendo as plântulas de alface manifestado menos sintomas visíveis de fitotoxicidade (**Tabela 3.8**). Reichman (2002) referiu que os principais sintomas comuns de fitotoxicidade foram o aparecimento de manchas acastanhadas e necróticas nas folhas, o escurecimento das raízes, e cloroses nas folhas mais velhas. No caso das duas cultivares de alface apenas os dois últimos sintomas são observados.

#### *Conclusões intercalares*

Em geral, em ambas as cultivares, após 10 dias de tratamento, ocorre uma diminuição no tamanho da folha devido ao aumento da concentração de EPT, para todos os elementos estudados. Em plântulas de alface expostas a elevadas concentrações de Cd e Cu observa-se o aparecimento de cloroses e necroses nas folhas jovens.

O efeito tóxico dos EPTs é mais evidente nas raízes jovens, de ambas as cultivares de alface, e esse efeito não ocorre apenas devido à diminuição substancial do comprimento da raiz, comparativamente ao controlo, mas também a um escurecimento gradual das raízes (começando nas pontas), com o aumento da concentração de EPTs.

Com o presente estudo, para as duas cultivares de alface, é possível confirmar que o aumento da concentração de EPTs no meio, leva à diminuição gradual do crescimento das plântulas, com o conseqüente aparecimento sintomas que são visíveis, como a diminuição no tamanho das folhas, aparecimento de cloroses e acastanhamento das folhas, redução substancial do comprimento da raiz, escurecimento gradual da raiz e, em casos mais graves, o aparecimento de plântulas não viáveis e a morte de plântulas.



O Cd e o Cu são os elementos que induzem efeitos tóxicos visíveis mais graves nas plântulas de alface, que são possíveis de detetar mesmo com concentrações relativamente baixas (50  $\mu\text{M}$ ). Neste caso, nas concentrações mais elevadas utilizadas, observa-se a morte de plântulas durante o período do ensaio. A exposição a Cr ( $\geq 250 \mu\text{M}$ ), Pb ( $\geq 250 \mu\text{M}$ ), Ni (DP:  $\geq 100 \mu\text{M}$ ; M4E:  $\geq 50 \mu\text{M}$ ) e Zn ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ) leva ao aparecimento de sintomas visíveis de toxicidade característicos da exposição a elevadas concentrações de EPT. O Mn é o elemento que tem um efeito menos tóxico para as plântulas de alface ( $\geq 1000 \mu\text{M}$ ) e, em baixas concentrações, até há um aparente estímulo do crescimento (5-250  $\mu\text{M}$ ).

### 3.4.2. Taxa de germinação e plântulas viáveis

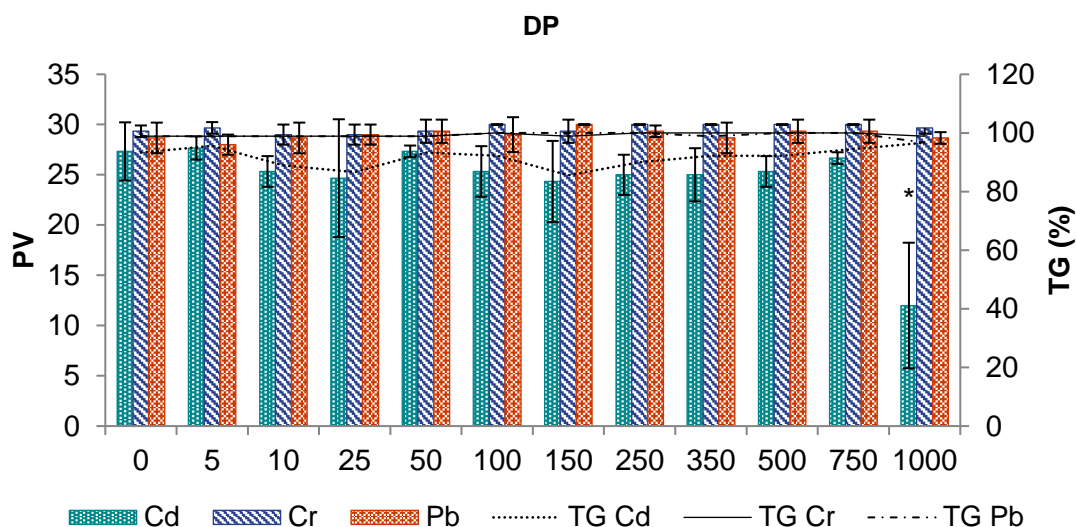
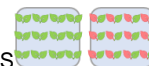
Os resultados obtidos para a TG e número de plântulas viáveis, encontram-se apresentados para a alface DP, nas **Figuras 3.9 e 3.10**, e para a alface M4E, nas **Figuras 3.11 e 3.12**.

#### *Taxa de germinação*

Não se verificam diferenças significativas na TG, em relação ao controlo, apesar do aumento da concentração de EPT, para todos os elementos testados e para ambas as cultivares de alface.

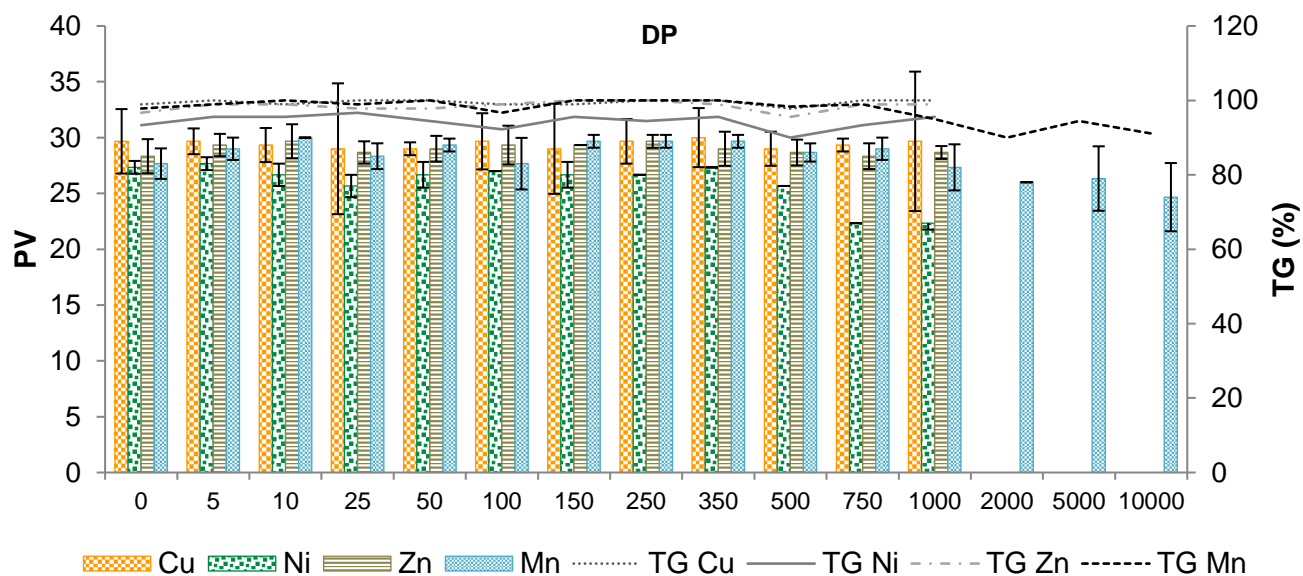
Nas plântulas expostas ao Cd existem algumas variações na TG da alface DP ( $> 86 \%$ ), enquanto na alface M4E, a TG manteve-se constante (98-100 %). No caso do Cr, Pb, Cu, Ni, Zn e Mn, a TG permanece constante,  $\geq 95,6 \%$ ,  $\geq 94 \%$ ,  $\geq 96 \%$ ,  $\geq 90 \%$ ,  $\geq 96 \%$ ,  $\geq 91 \%$  para as duas cultivares, respetivamente.

Este comportamento está de acordo com diversos estudos realizados por outros autores. An (2004) observou que a germinação das sementes demonstrou ser resistente à toxicidade de vários níveis de Cd utilizados (0, 40, 80, 160, 320 e 640  $\text{mg kg}^{-1}$ ), não tendo verificado diferenças significativas na TG para sorgo, pepino e milho-doce. Kopyra e Gwozdz (2003) aplicaram 500  $\mu\text{M}$  de Cd, em *Lupinus luteus*, e não verificaram nenhum efeito na TG, tal como foi observado no presente trabalho. Li et al. (2005) demonstraram que o Pb não foi muito tóxico na germinação de *Arabidopsis*, evidenciando que a estrutura protetora da semente foi seletiva na penetração dos diferentes EPTs. Também verificaram que as sementes continuaram a germinar na presença de elevadas concentrações de Pb ( $\approx 100\,000 \mu\text{M}$ ), mas o posterior crescimento das plântulas foi severamente inibido, mesmo para concentrações muito mais baixas.



**Figura 3.9** – Número de plântulas viáveis (PV) e taxa de germinação (TG) (%), na alface DP, expostas a Cd, Cr ou Pb, ao fim de 10 dias de tratamento.

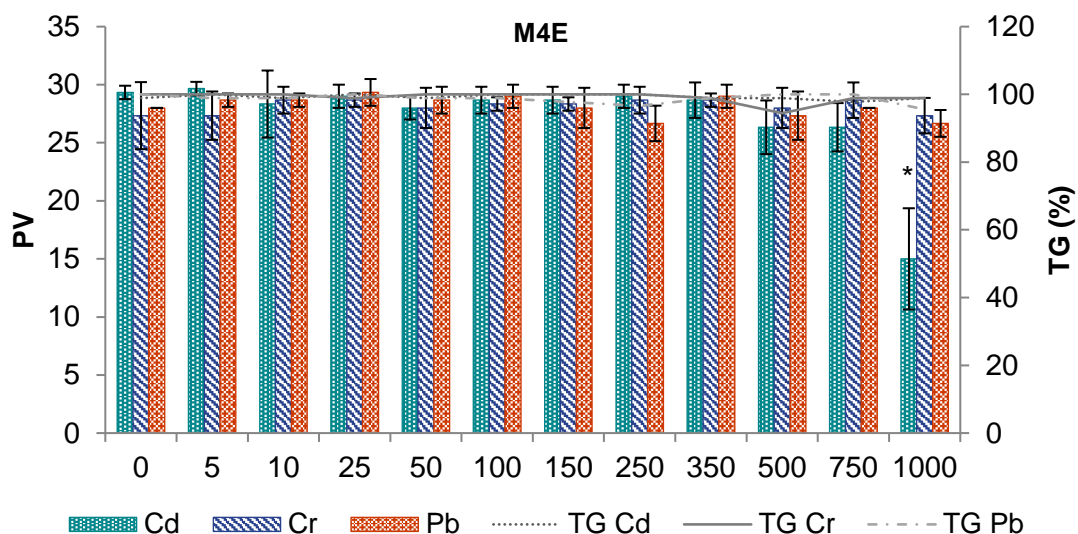
As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=3).



**Figura 3.10** – Número de plântulas viáveis (PV) e taxa de germinação (TG) (%), na alface DP, expostas a Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento.

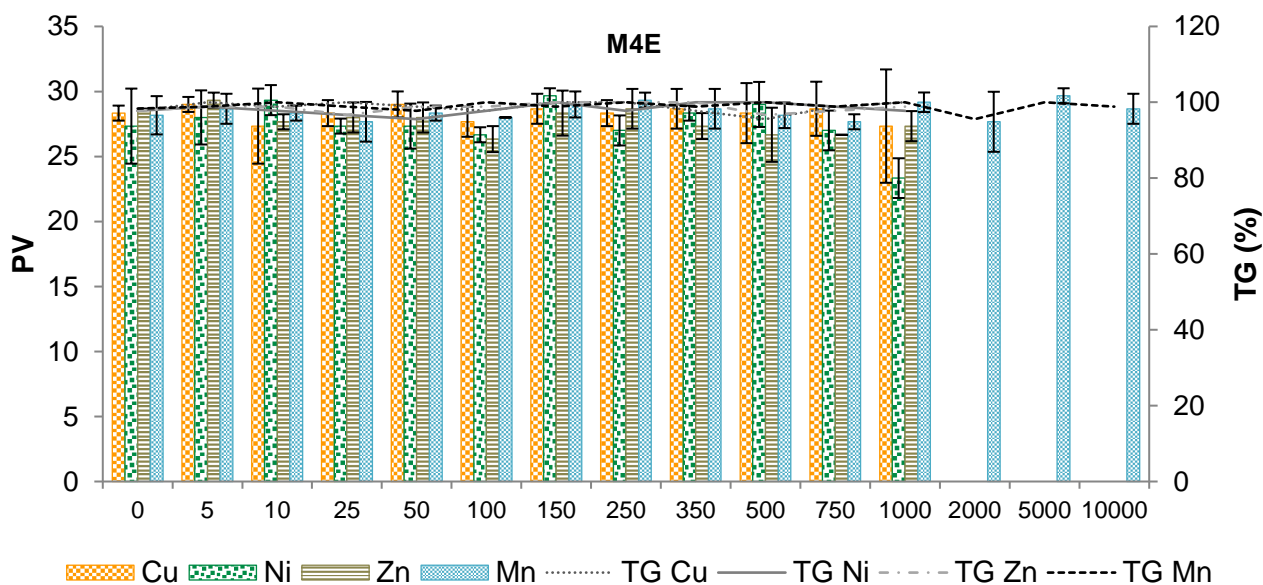
As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=3).





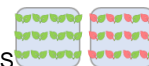
**Figura 3.11** – Número de plântulas viáveis (PV) e taxa de germinação (TG) (%), na alface M4E, expostas a Cd, Cr ou Pb, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=3).



**Figura 3.12** – Número de plântulas viáveis (PV) e taxa de germinação (TG) (%), na alface M4E, expostas a Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=3).



Estes autores também referem que os elementos essenciais, como o Cu e Zn, não foram muito tóxicos na germinação de sementes de *Arabidopsis*, mas levaram a uma forte inibição do crescimento posterior das plântulas, inclusive quando submetidas a concentrações relativamente baixas.

Di Salvatore et al. (Di Salvatore et al., 2008) obtiveram um resultado semelhante a este estudo, em alface, brócolo, tomate e rabanete, referindo que nas concentrações utilizadas, de Cd e Pb (2-1024  $\mu\text{M}$ ), não se verificaram diferenças significativas na TG, em relação ao controle, permanecendo esta constante ( $> 90 \%$ ). Os mesmos autores verificaram que não existiram diferenças significativas na TG das mesmas plantas, numa gama de concentrações de Cu e Ni muito similares às utilizadas no presente estudo.

Num ensaio efetuado por Bautista et al. (2013), com a aplicação de 25, 35 e 50  $\mu\text{M}$  de Cr, também não se obtiveram diferenças significativas na TG, em plântulas de *Lactuca sativa* cv batávia, o que está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo com as duas cultivares de alface. Samantary (2002) comparou cultivares tolerantes e sensíveis de feijão-preto (*Vigna radiata*), em meios contaminados com 24, 48, 96 e 192  $\mu\text{M}$  de Cr, e verificou que as cultivares tolerantes cresceram em todas as concentrações de Cr testadas, como acontece com as plântulas de alface utilizadas neste estudo. Marquez-Garcia et al. (2013) verificaram que diferentes concentrações de Cu, Mn, Ni e Zn (10 a 2000  $\mu\text{M}$ ) também não influenciaram a TG ( $\approx 100 \%$ ) de *Atriplex halimus*, não havendo diferenças significativas em relação ao controle.

Novo e González (2014) verificaram que não houve diferenças significativas na TG, de *Brassica juncea*, em solos contaminados com Cu. Em *Bowiea volubilis* e *Merwillia natalensis* (Street et al., 2007), a presença de concentrações crescentes de Cu e Zn não teve efeito na TG. Marichali et al. (2014) e Martínez-Fernández et al. (2011) verificaram que a presença de concentrações crescentes de Zn não teve influência na germinação de sementes de coentros (100, 1000 e 2000  $\mu\text{M}$ ) e *Bituminaria betuminosa* (1,5; 15 ou 150  $\mu\text{M}$ ). Visioli et al. (2014) referiram que não existiram diferenças significativas na TG, em todas as concentrações de Ni aplicadas (50-1700  $\mu\text{M}$ ), como se verifica para as plântulas de alface. No entanto, os autores verificaram uma inibição da germinação para a concentração mais elevada de Ni (1700  $\mu\text{M}$ ), o que não se verifica neste estudo.

Neste sentido, embora não sejam concordantes com os resultados obtidos, existem estudos com uma gama de concentrações semelhantes ao presente estudo, em que a TG foi inibida pela presença de EPTs. Liu et al. (2012), Liu et al. (2007) e Ahsan et al. (2007a) verificaram

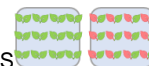


uma diminuição na TG resultante da exposição crescente a Cd, em *Suaeda salsa* (0,9  $\mu\text{M}$ ), *Triticum aestivum* (9, 18, 36, 71  $\mu\text{M}$ ) e *Oryza sativa* (2, 4, 5, 7, 9  $\mu\text{M}$ ), respetivamente. Bautista et al. (2013) referiram que a aplicação de Cd (0, 25, 35 e 50  $\mu\text{M}$ ) diminuiu a TG em *Lactuca sativa* (cultivar batávia), havendo diferenças significativas para todas as concentrações de Cd aplicadas, contrariamente ao que é obtido neste estudo.

Outros estudos referem que ocorreu uma diminuição da TG, com o aumento da concentração de Cr, em luzerna (192, 385 e 769  $\mu\text{M}$ ) (Peralta et al., 2001), aipo (10-1000  $\mu\text{M}$ ) (Scoccianti et al., 2006) e melão (962-5770  $\mu\text{M}$ ) (Akinci e Akinci, 2010). A presença de Cu diminuiu a TG, em trigo (79, 393, 787 e 1574  $\mu\text{M}$ ) (Singh et al., 2007), (3000, 5000, 7000 e 9000  $\mu\text{M}$ ) (Zhang et al., 2008), ervilha (5000  $\mu\text{M}$ ) (Mihoub et al., 2005), arroz (1000, 1500 e 2000  $\mu\text{M}$ ) (Ahsan et al., 2007b) e feijão (5000  $\mu\text{M}$ ) (Sfahi-Bousbih et al., 2010a). Ozdener e Kutbay (2009) referem que o Cu foi o elemento que teve maior efeito inibitório na germinação de rúcula e ocorreu uma diminuição significativa da TG, com o aumento da concentração de Cu, sendo este decréscimo mais acentuado para as concentrações mais elevadas (8, 12 e 16  $\mu\text{M}$ ). Mumthas et al. (2010) também verificaram uma diminuição da TG, com a exposição a concentrações crescentes de Mn (91, 182, 455, 910 e 1820  $\mu\text{M}$ ). Peralta et al. (2001) e Yadav et al. (2009) referem um efeito tóxico do Ni, na TG, em luzerna (300 mM) e rabanete (100-1000  $\mu\text{M}$ ), respetivamente.

Uma explicação possível para não se ter verificado diferenças na TG das plântulas de alface, é o efeito do tegumento da semente que impede o contacto dos EPTs com o embrião, encontrando-se este protegido. A alface não é considerada uma espécie com permeabilidade ao Pb, uma vez que não pertence à família das espécies identificadas com permeabilidade a este elemento (Wierzbicka e Obidzińska, 1998). O efeito na TG depende diretamente da cultivar da planta escolhida. Na presença de plantas com permeabilidade ao Pb, já é notório o efeito contrário. Isto está de acordo com os resultados obtidos por Lamhamdi et al. (2011) onde foi estudado o efeito de diferentes concentrações de Pb (150, 300, 1500 e 3000  $\mu\text{M}$ ), na germinação de trigo, verificando-se uma diminuição da TG. Ozdener e Kutbay (2009) observaram que a germinação das sementes de rúcula (*Eruca sativa*) ocorreu até nas concentrações mais elevadas utilizadas, contudo a TG foi substancialmente reduzida com o aumento da concentração de Pb (0,12-4,83  $\mu\text{M}$ ) e Cd (0,22-8,90  $\mu\text{M}$ ). Os autores referiram que o nível de tolerância foi maior na germinação da semente, do que no posterior desenvolvimento das plântulas de rúcula. Isto também se verifica para as duas cultivares alface do presente trabalho, não havendo efeito tóxico direto na TG, com a exposição crescente a Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn ou Mn. Apesar de o Cu, Ni, Zn e Mn serem considerados elementos essenciais, e em baixas concentrações poderem estimular a germinação, não se





verifica nas plântulas de alface nenhum efeito na TG. Por esta razão, há autores que referem que o processo germinativo não é suficiente para ser utilizado como indicador de toxicidade a um dado EPT (An et al., 2004).

Liu et al. (2007) referiram que a germinação da semente depende, quase exclusivamente, da hidrólise das reservas para o fornecimento de metabolitos para o crescimento do embrião, bem como substratos para vários processos metabólicos. O amido é a reserva energética mais abundante nas sementes e as evidências disponíveis indicam que, na germinação, o amido é degradado predominantemente através da  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase. No estudo efetuado por estes autores, as atividades destas enzimas foram significativamente afetadas negativamente pelas concentrações mais elevadas de Cd. A  $\alpha$ -amilase é a principal enzima envolvida na degradação inicial do amido em formas mais solúveis, enquanto que a fosforilase e a  $\beta$ -amilase ajudam na conversão adicional em açúcares livres que proporcionam a nutrição da germinação das sementes. A redução da atividade das amilases pode, portanto, ser o principal fator envolvido na diminuição da germinação das sementes. Zeid (2001) também refere que uma diminuição na taxa de germinação e, no posterior crescimento da raiz, poderá ser atribuído ao efeito negativo de EPTs na atividade da  $\alpha$ -amilase e, conseqüentemente, no fornecimento de nutrientes para o embrião em desenvolvimento.

#### *Número de plântulas viáveis*

Relativamente ao número de plântulas viáveis é possível verificar que não existem diferenças significativas para todas as concentrações de Cr, Pb, Cu, Ni, Zn e Mn testadas. Apenas a exposição a 1000  $\mu$ M de Cd resulta em diferenças significativas, relativamente ao controlo, nas duas cultivares de alface. Considera-se que a semente germinou devido à exposição da radícula, no entanto, obtêm-se plântulas de alface não viáveis. Neste caso, o número de plântulas viáveis poderá estar relacionado com a concentração do elemento aplicado no meio. Estes resultados já evidenciam a grande sensibilidade da alface ao Cd. Num estudo realizado por Liu et al. (2007), os autores referiram que o Cd pode facilmente penetrar no córtex radicular e, conseqüentemente, as raízes provavelmente vão ser o primeiro alvo do Cd.

Li et al. (2005) também mencionaram que as sementes de *Arabidopsis thaliana* germinaram, ocorrendo a protusão da raiz, mas depois não atingiram o comprimento da radícula desejado e definido pelos autores ( $\geq 5$  mm) para serem consideradas germinadas. Os autores disseram que este resultado se deve à presença do EPT, que entra em contacto direto com a raiz em desenvolvimento, após a sua exposição. Os resultados obtidos por estes autores sugeriram que as sementes ainda germinaram na presença de concentrações elevadas (100 000  $\mu$ M,



Cu, Pb, Zn), mas o crescimento subsequente (após a quebra do tegumento da semente) foi inibido em meios com concentrações muito mais baixas. Por exemplo, o Cu não foi muito tóxico para a germinação da semente, mas foi para o posterior crescimento. Os autores refeririam que a capacidade de uma semente germinar e este desenvolvimento inicial, num meio contaminado com EPTs, poderá ser um indicativo do seu nível de tolerância. Zeid (2001) também faz referência que a germinação da semente pode não ser afetada pela presença de EPTs, mas quando a radícula em emergência entra em contacto com o meio contaminado, o seu crescimento poderá ser inibido.

### *Conclusões intercalares*

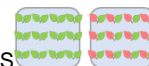
As sementes de ambas as cultivares de alface germinam em todas as concentrações de EPTs utilizadas, não havendo diferenças significativas na TG. Os resultados obtidos sugerem que as duas cultivares de alface utilizadas, neste trabalho, possuem sementes muito resistentes à presença de diferentes EPTs mesmo em concentrações relativamente altas.

Por outro lado, aparentemente, também não houve diferença entre um elemento não essencial ou essencial presente no meio, devido ao efeito barreira do tegumento da semente que vai dificultar a passagem entre o embrião e o meio exterior. Os resultados obtidos para as plântulas de alface sugerem que o tegumento da semente tem uma importante função seletiva na permeabilidade dos diferentes EPTs, uma vez que a TG se mantém estável na presença de elevadas concentrações de elemento. Os resultados obtidos para as duas cultivares de alface permitem concluir que a TG está relacionada principalmente com a permeabilidade do tegumento da semente e não com a embebição, e que depende diretamente da cultivar da planta escolhida.

Após a exposição da radícula e apesar de existir contacto direto com o EPT, não se verificam diferenças significativas no número de plântulas viáveis, com exceção do Cd. Isto evidencia uma certa tolerância da plântula de alface relativamente aos outros EPTs, sugerindo que, nesta fase de desenvolvimento, a alface parece ser sensível apenas ao cádmio em concentrações muito elevadas (1000  $\mu$ M).

### **3.4.3. Massa fresca da parte aérea e raiz**

Após se analisar a TG, mediu-se a massa da parte aérea e da raiz, ao fim de 10 dias de tratamento. Nas **Figuras 3.13 a 3.19** encontram-se os resultados obtidos para a massa fresca da parte aérea e da raiz para as duas cultivares de alface.

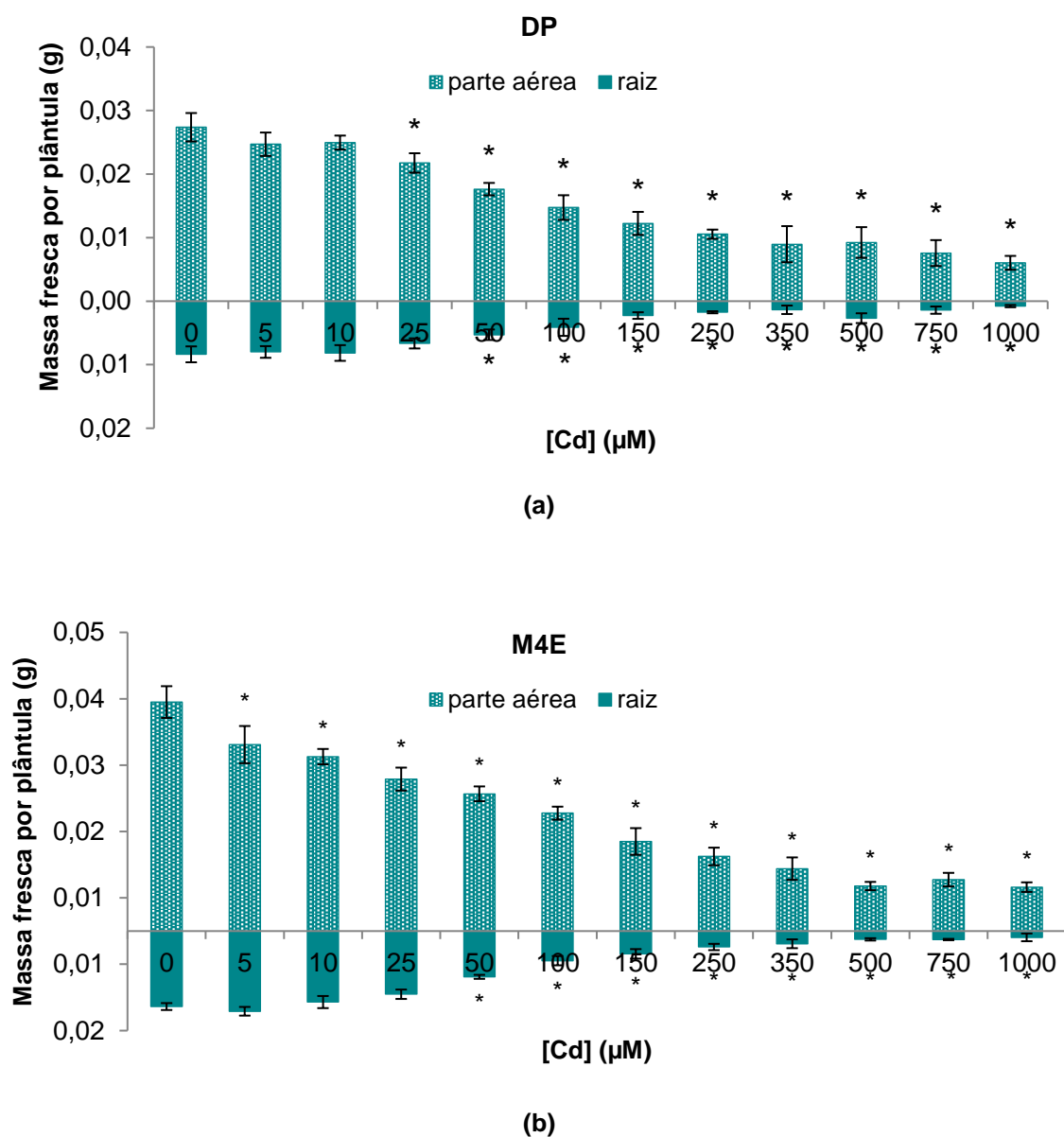


Nas duas cultivares de alface há uma diminuição acentuada da massa fresca da parte aérea e da raiz à medida que a concentração de Cd aumenta (**Figura 3.13**). Na alface DP, as diferenças são significativas a partir de 25  $\mu\text{M}$  e de 50  $\mu\text{M}$ , para a parte aérea e raiz, respectivamente. Nas plântulas de alface M4E verificam-se diferenças significativas na massa fresca da parte aérea, para concentrações mais baixas de Cd ( $\geq 5 \mu\text{M}$ ). Este comportamento evidencia que esta cultivar apresenta uma menor tolerância ao Cd. Neste caso, a massa fresca da parte aérea revelou ser um bom indicador do efeito fitotóxico do Cd, especialmente a parte aérea da alface em que os efeitos da toxicidade do Cd são mais evidentes do que na raiz. No entanto, quando se observa a diminuição de crescimento, em termos percentuais verifica-se que, no caso das concentrações mais elevadas, o crescimento da raiz é mais afetado que a parte aérea.

Na **Figura 3.14** estão apresentados os dados obtidos para a massa fresca da parte aérea e da raiz, para as plântulas expostas a Cr. Nas duas cultivares de alface existe uma diminuição significativa da massa fresca da parte aérea a partir de 250  $\mu\text{M}$  de Cr. A biomassa da raiz apresenta um comportamento decrescente significativo para concentrações  $\geq 1000 \mu\text{M}$  e  $\geq 250 \mu\text{M}$  para a alface DP e M4E, respectivamente. Na alface M4E verifica-se que o crescimento da raiz é ligeiramente mais afetado que a parte aérea, para as concentrações mais elevadas. Apenas, para as plântulas da alface DP se observa um estímulo significativo no crescimento das raízes para baixas concentrações de contaminante (50, 100 e 150  $\mu\text{M}$  de Cr). Este comportamento evidencia que o Cr teve um efeito menos tóxico nesta cultivar do que nas plântulas de alface M4E.

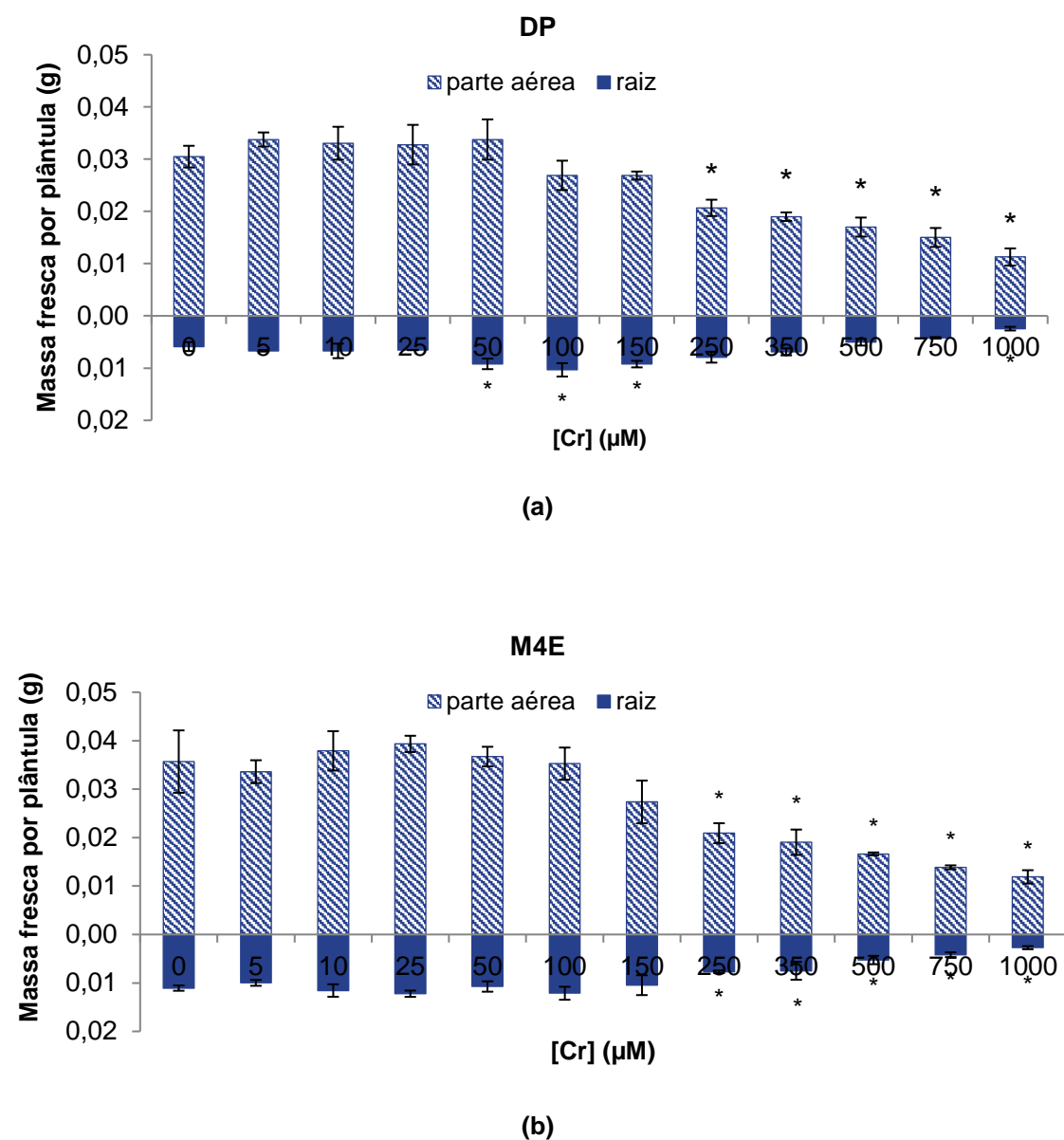
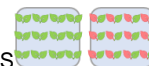
O estímulo significativo no crescimento das raízes também foi observado por Peralta et al. (2001) onde verificaram um maior crescimento das raízes nas concentrações mais baixas de Cr (96 e 192  $\mu\text{M}$ ). Bautista et al. (2013) demonstraram o mesmo comportamento em alface e acelga, em que a presença de Cr, em vez de inibir o crescimento da raiz, estimulou o seu crescimento, havendo diferenças significativas nas plântulas expostas a 35 e 25  $\mu\text{M}$  de Cr, respectivamente. Santos e Rodriguez (2012) também indicaram que baixas concentrações de Cr (0,96-19,23  $\mu\text{M}$ ) promoveram o crescimento.

Em ambas as cultivares de alface existe uma tendência para um decréscimo da massa fresca, da parte aérea e da raiz, com o aumento da concentração de Pb (**Figura 3.15**). Existe uma diminuição da massa fresca à medida que a concentração de Pb aumenta, havendo diferenças significativas a partir de 250  $\mu\text{M}$  e 150  $\mu\text{M}$ , para a parte aérea e raiz da alface DP, respectivamente.



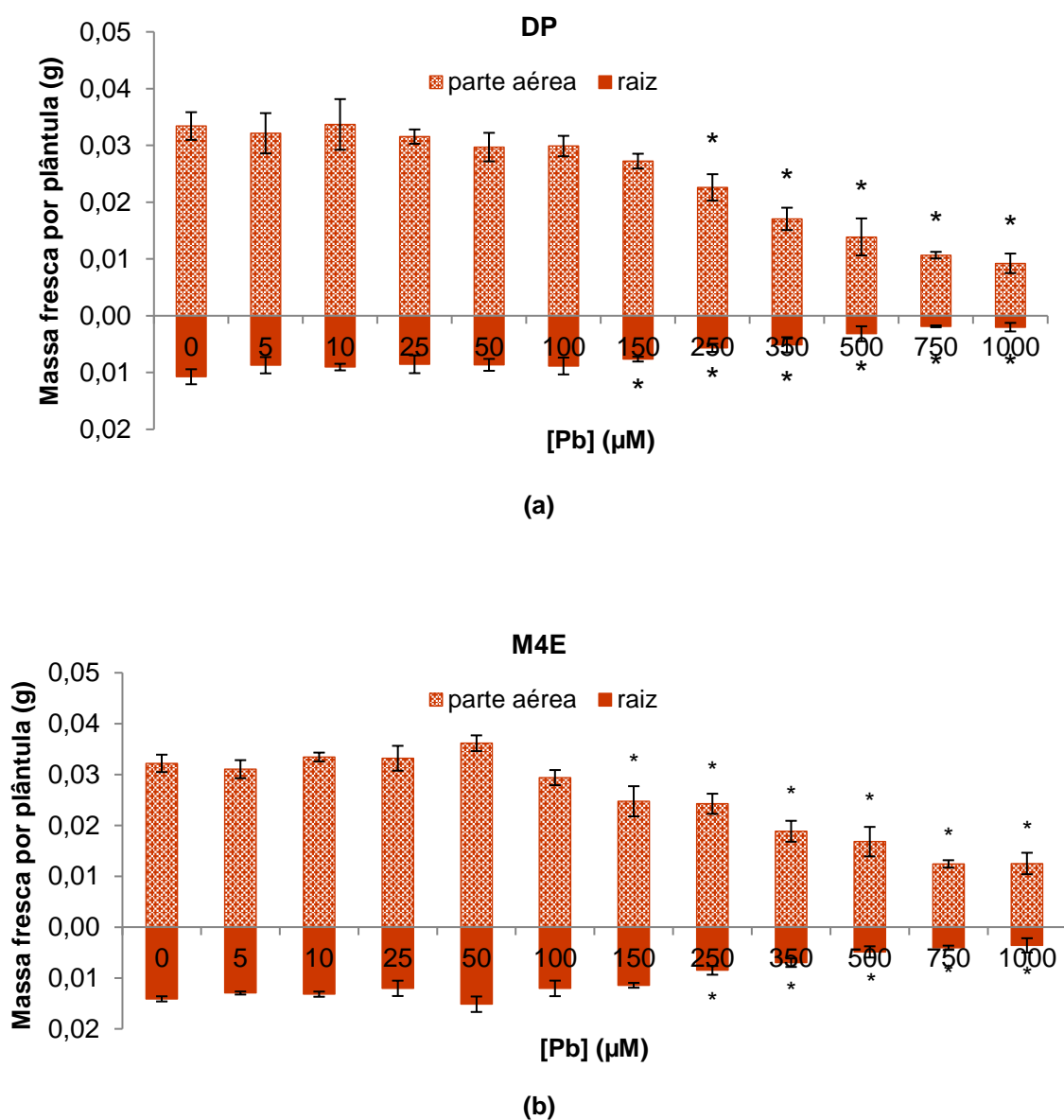
**Figura 3.13** – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alface DP (a) e alface M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Cd, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=3).



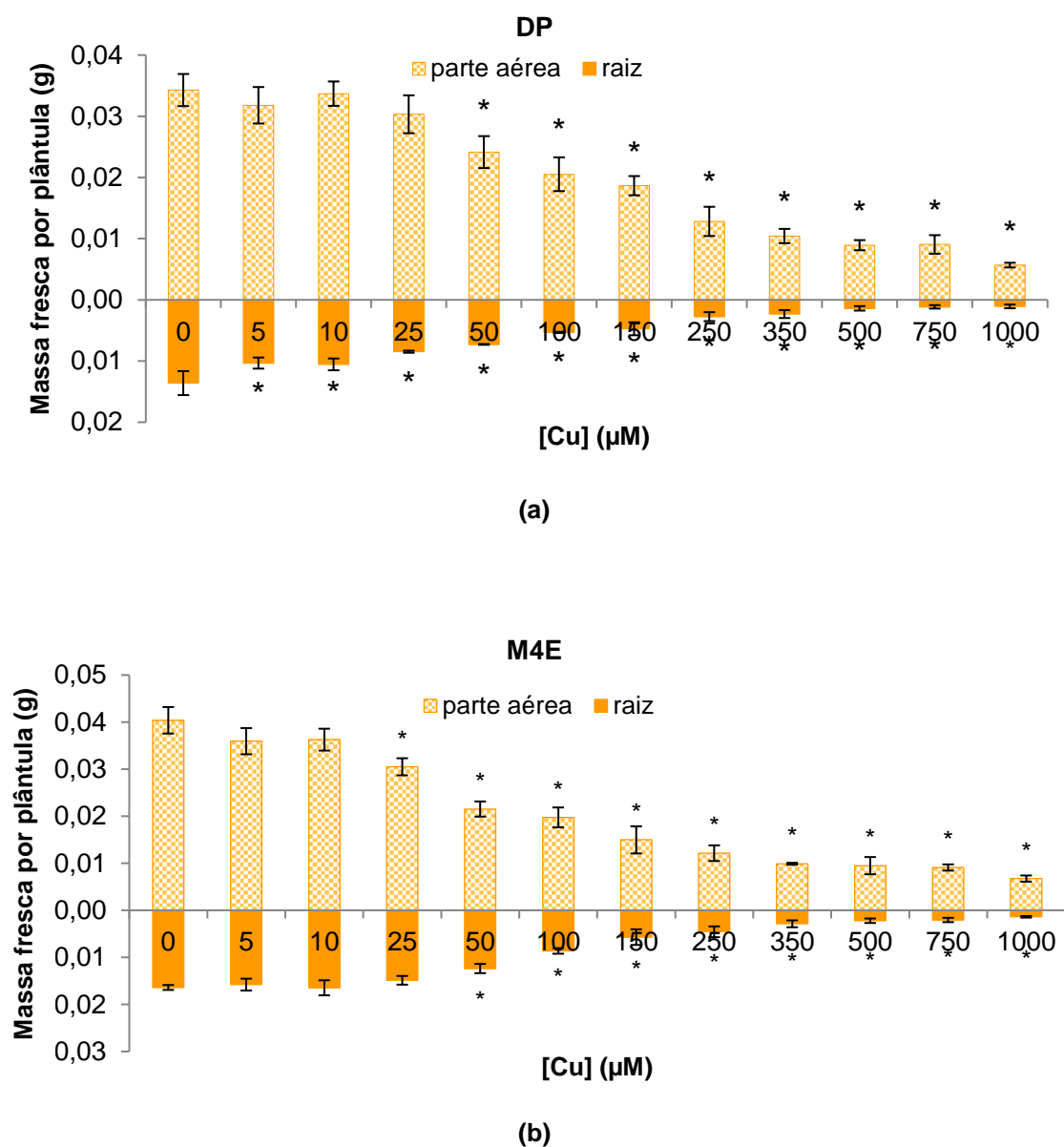
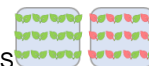
**Figura 3.14** – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alfaca DP (a) e alfaca M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Cr, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=3).



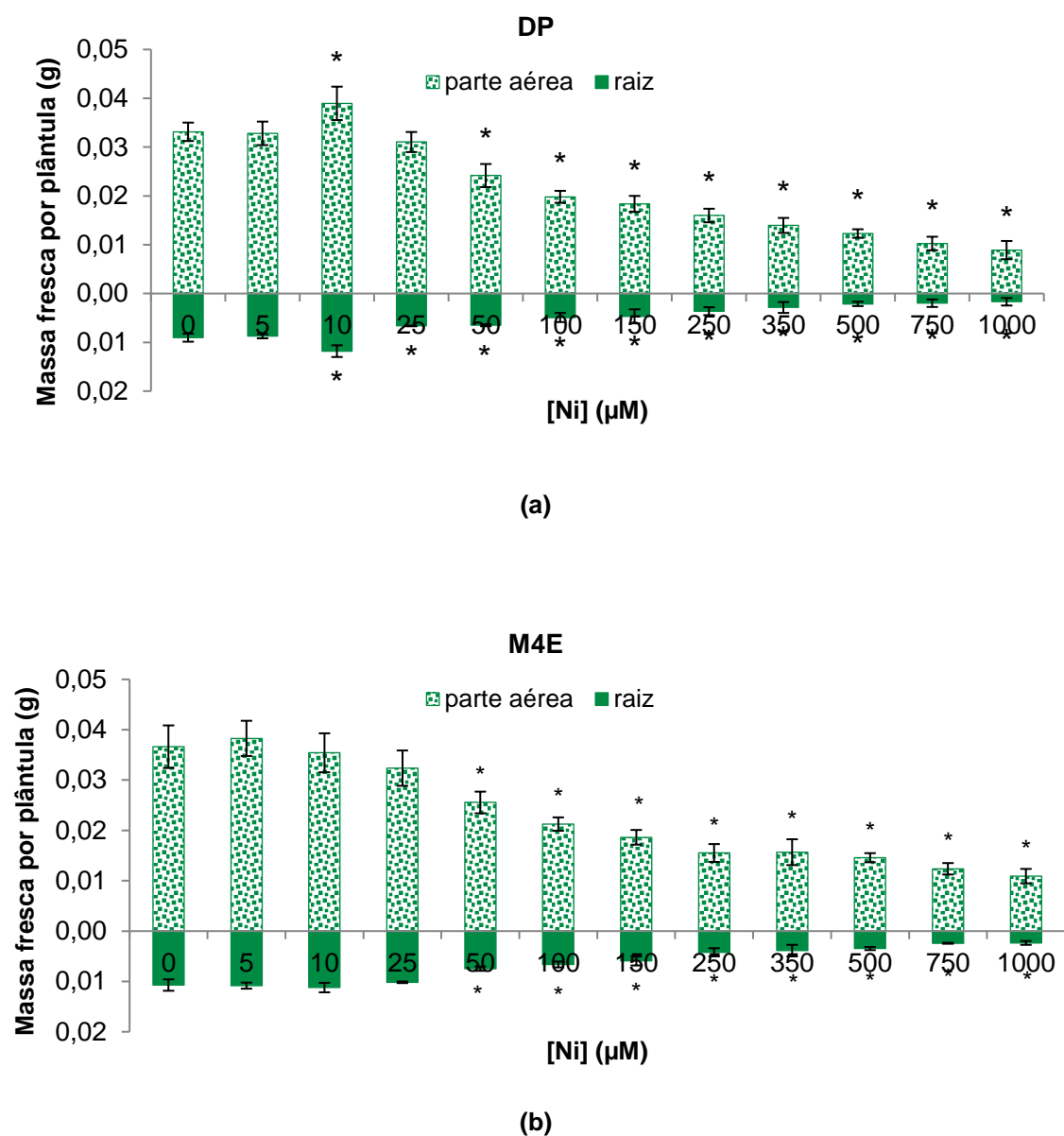
**Figura 3.15** – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alface DP (a) e alface M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Pb, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 3.16** – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alface DP (a) e alface M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Cu, ao fim de 10 dias de tratamento.

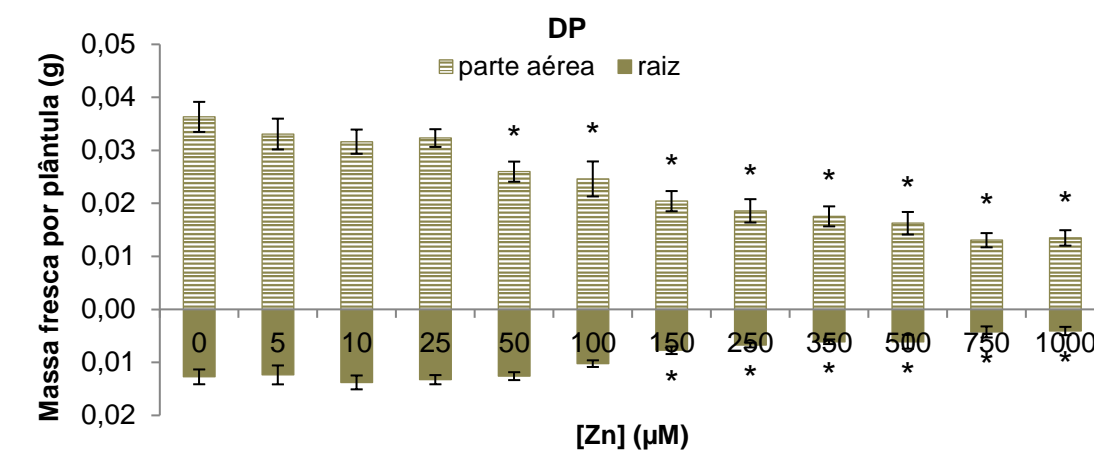
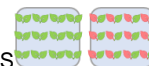
As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=3).



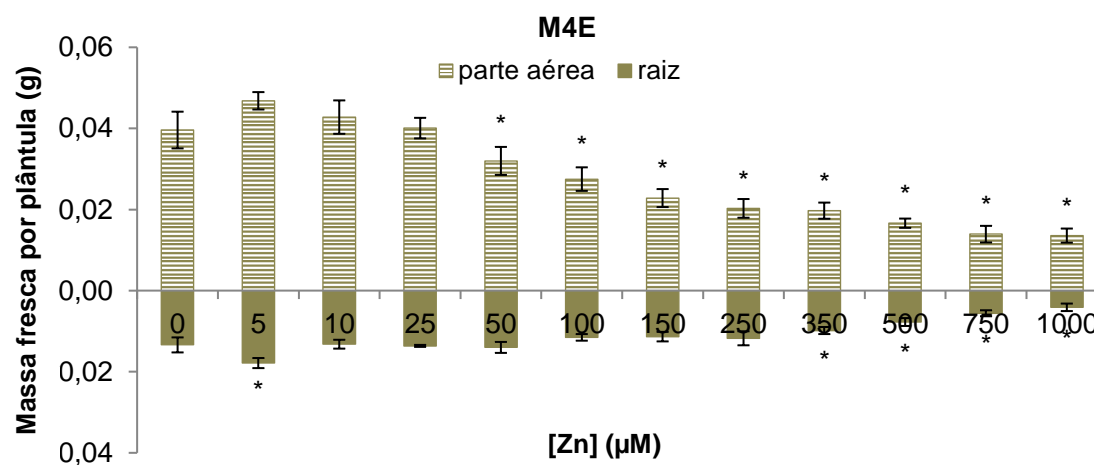
**Figura 3.17** – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alface DP (a) e alface M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Ni, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=3).





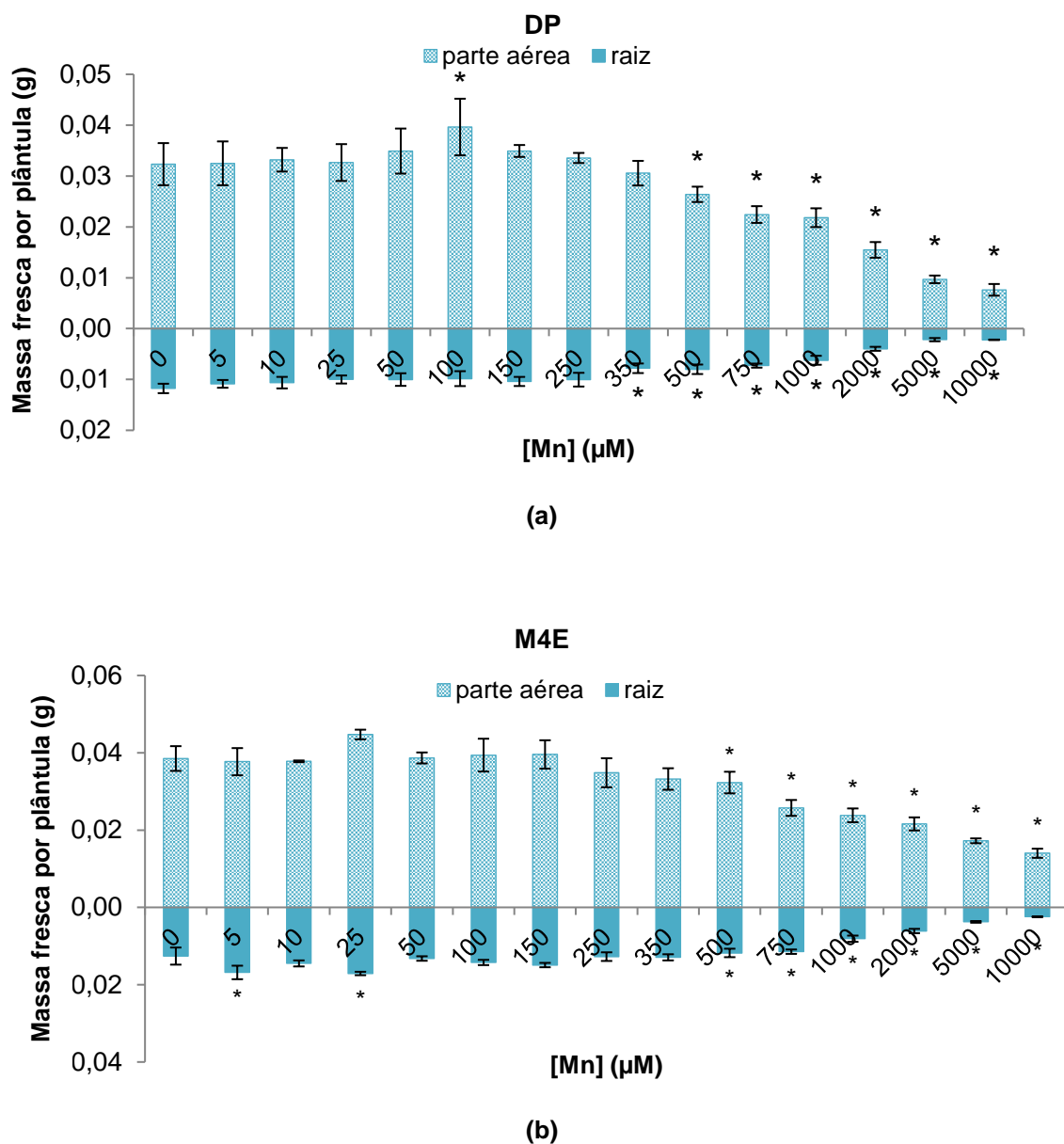
(a)



(b)

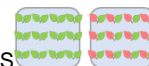
**Figura 3.18** – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alface DP (a) e alface M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Zn, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=3).



**Figura 3.19** – Massa fresca média da parte aérea e da raiz, por plântula, em alface DP (a) e alface M4E (b) expostas a diferentes concentrações de Mn, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=3).



Na alface M4E, esta diminuição é significativa a partir de 150  $\mu\text{M}$  e 250  $\mu\text{M}$ , para a parte aérea e raiz, respetivamente. Quando se compara esta diminuição de crescimento, em termos percentuais, verifica-se que, no caso das concentrações mais elevadas, o crescimento da raiz é muito mais afetado que a parte aérea, para ambas as cultivares.

O efeito das concentrações crescentes de Cu, na massa fresca da parte aérea e da raiz, das duas cultivares de alface, está apresentado nas **Figura 3.16**. A massa fresca também diminui com o aumento da concentração de Cu aplicada. Na alface M4E, este comportamento é observado a partir de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , para a parte aérea e raiz, respetivamente. Esta tendência é observada, para a alface DP, a partir de 50  $\mu\text{M}$ , para a parte aérea, e ocorre uma diminuição muito acentuada da massa fresca da raiz a partir de 5  $\mu\text{M}$ , havendo diferenças significativas para todas as concentrações de Cu aplicadas. É possível verificar que nesta cultivar, o Cu tem um maior efeito na raiz do que na parte aérea. Neste caso, observa-se que a massa fresca da raiz poderá ser um melhor indicador do efeito fitotóxico do Cu para a alface DP. Quando se observa a percentagem de inibição do crescimento verifica-se, que para ambas as cultivares, o crescimento da raiz é muito mais afetado que a parte aérea, no caso das concentrações mais elevadas. Este comportamento verifica-se também para as plântulas expostas a Cd e Pb, podendo esta sensibilidade da raiz ser preferencialmente comum para a alface.

Tal como para os outros EPTs em estudo, as plântulas expostas ao Ni também apresentam o mesmo comportamento, uma diminuição da massa fresca com o aumento da quantidade de elemento aplicada (**Figura 3.17**). Na alface M4E, ocorre uma diminuição significativa da massa fresca, da parte aérea e raiz, a partir de 50  $\mu\text{M}$ . Na alface DP, este comportamento é significativo a partir de 50  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , para a parte aérea e raiz, respetivamente. Nesta cultivar também se observa um estímulo do crescimento da parte aérea e da raiz, havendo diferenças significativas, relativamente ao controlo, com a exposição a 10  $\mu\text{M}$  de Ni. Apesar de as plântulas de alface serem referidas como sensíveis à presença de Ni, verifica-se uma estimulação do crescimento da raiz para baixas concentrações de EPT (Carlson et al., 1991; Zhi et al., 2015). Visioli et al. (2014) também mencionaram que baixas concentrações de Ni, podem estimular o crescimento da raiz, tal como se verifica no presente estudo

Nos ensaios realizados com Zn, observa-se a mesma tendência que se verificou para os EPTs anteriores (**Figura 3.18**). As duas cultivares apresentam uma diminuição significativa na massa fresca da parte aérea, a partir de 50  $\mu\text{M}$ . Por outro lado, na raiz, este decréscimo é significativo a partir de 150  $\mu\text{M}$  e 350  $\mu\text{M}$ , para a alface DP e M4E, respetivamente. Observa-se assim que, neste caso, a massa da parte aérea é um melhor indicador do efeito fitotóxico



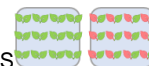
do Zn que a raiz. Quando observamos a inibição de crescimento, em termos percentuais, verificamos que, no caso das concentrações mais elevadas, o crescimento da raiz é mais afetado que a parte aérea, tal como se verificou para o Cd, Pb, Cu e Ni. Por outro lado, nas plântulas de alface M4E expostas a Zn também se verifica um estímulo do crescimento da biomassa da raiz (5  $\mu\text{M}$ ), tal como se verificou, anteriormente, para as plântulas de alface DP expostas baixas concentrações de Ni ou Cr. Street et al. (2007) observaram um estímulo de crescimento na presença de elementos essenciais, como o Cu e Zn, havendo um aumento da massa fresca das plântulas expostas a 31  $\mu\text{M}$  de Zn. Zhi et al. (2015) também verificaram que a massa fresca das plântulas de rúcula aumentou quando expostas a concentrações entre 200-5000  $\mu\text{M}$  de Zn.

Este efeito de estímulo do crescimento observado para a massa fresca de plântulas expostas a Cr, Ni e Zn, foi referido anteriormente no subcapítulo **3.2.3.1**. Bailly et al. (2008) referiram que baixas concentrações de EPTs têm um efeito na estimulação do crescimento de plântulas, devido ao aumento do nível de stresse oxidativo, que poderá originar um aumento da sinalização das ROS. Este estímulo também foi referido pelo autor devido ao aumento das defesas da planta jovem.

O Mn é o elemento que apresenta menor toxicidade para as plantas de alface (**Figura 3.19**). Tal como se verifica com outros EPTs, a presença de Mn também provoca um estímulo do crescimento da parte aérea (até 100  $\mu\text{M}$ ) e da raiz (5 e 25  $\mu\text{M}$ ), para a alface DP e M4E, respetivamente. Ambas as cultivares apenas apresentam uma diminuição significativa da massa fresca da parte aérea a partir de 500  $\mu\text{M}$ . A diminuição da massa fresca da raiz também só é significativa a partir de 350  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$ , para a alface DP e M4E, respetivamente. A exposição a concentrações mais elevadas, 2000, 5000 e 10000  $\mu\text{M}$  afeta de forma notória estas duas variáveis. Para ambas as cultivares é visível que a diminuição de crescimento da raiz, em termos percentuais, é mais afetada que a parte aérea para as concentrações mais elevadas aplicadas.

Com o propósito de suportar o que foi descrito anteriormente, também foram calculados os índices de inibição do crescimento (**Tabela 3.9**) e de vigor das plântulas (**Tabela 3.10**), em relação ao efeito da presença de EPTs, para cada uma das cultivares em estudo.

As plântulas de alface DP (**Tabela 3.9-a**) são mais sensíveis à presença de Cd, sendo o único EPT que manifesta o seu efeito negativo, na massa fresca da parte aérea, para concentrações mais baixas de elemento ( $\geq 25$   $\mu\text{M}$ ), comparativamente ao Cr ( $\geq 250$   $\mu\text{M}$ , 63 %) e Pb ( $\geq 250$   $\mu\text{M}$ , 72 %), com um aumento concomitante na percentagem de inibição.



**Tabela 3.9** – Índice de inibição do crescimento, da parte aérea e da raiz, em plântulas de alface DP (a) e M4E (b), sujeitas a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento.

		Índice de inibição do crescimento (%)																
		Concentração de EPT (µM)																
	EPT	0	5	10	25	50	100	150	250	350	500	750	1000	2000	5000	10000		
parte aérea	Cd	0	10	9	21	36	46	55	61	67	66	72	78					
	Cr	0	-11	-8	-8	-11	12	12	32	38	44	51	63					
	Pb	0	4	-1	6	11	11	18	32	49	58	68	72					
	Cu	0	7	2	12	30	40	46	63	70	74	74	83					
	Ni	0	1	-18	6	27	40	45	52	58	63	69	73					
	Zn	0	9	13	11	28	32	44	49	52	55	64	63					
	Mn	0	-1	-3	-1	-8	-23	-8	-4	5	18	31	33	52	70	76		
raiz	Cd	0	4	3	21	37	51	73	79	84	68	83	91					
	Cr	0	-14	-14	-11	-56	-76	-57	-35	-17	14	28	58					
	Pb	0	19	16	20	20	18	29	47	52	70	83	81					
	Cu	0	24	23	38	46	61	65	80	83	90	92	92					
	Ni	0	3	-30	27	28	46	48	60	68	76	78	81					
	Zn	0	3	-8	-4	1	20	39	47	52	52	67	68					
	Mn	0	8	10	15	15	16	12	15	34	32	38	47	66	82	81		

(a)

		Índice de inibição do crescimento (%)																
		Concentração de EPT (µM)																
	EPT	0	5	10	25	50	100	150	250	350	500	750	1000	2000	5000	10000		
parte aérea	Cd	0	19	24	34	40	49	61	67	73	80	78	81					
	Cr	0	6	-6	-10	-3	1	23	41	47	53	61	67					
	Pb	0	4	-4	-3	-12	9	23	25	41	48	61	61					
	Cu	0	11	10	24	47	51	63	70	75	76	77	83					
	Ni	0	-5	3	12	30	42	49	58	57	60	66	70					
	Zn	0	-18	-8	-1	19	31	42	49	50	58	65	66					
	Mn	0	2	2	-16	0	-2	-3	10	14	16	33	38	44	55	64		
raiz	Cd	0	-6	6	16	39	61	70	79	83	89	89	92					
	Cr	0	10	-5	-11	3	-10	5	30	32	52	62	75					
	Pb	0	8	7	15	-7	15	19	40	50	65	71	75					
	Cu	0	4	0	9	25	47	65	72	83	87	88	92					
	Ni	0	-1	-5	5	30	38	45	61	64	68	77	78					
	Zn	0	-33	1	-2	-5	14	15	12	26	42	58	69					
	Mn	0	-34	-15	-36	-5	-13	-18	-1	-3	6	9	36	51	70	81		

(b)

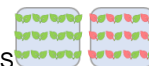
O **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.



**Tabela 3.10** – Índice de vigor das plântulas para as duas cultivares de alface, submetidas a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento.

		Índice de vigor das plântulas														
		Concentração de EPT (µM)														
EPT	Cultivar	0	5	10	25	50	100	150	250	350	500	750	1000	2000	5000	10000
Cd	DP	873,2	687,6	585,1	284,2	200,6	79,1	39,2	24,1	29,0	29,7	20,5	7,1			
	M4E	1051,2	834,4	721,9	652,1	303,1	203,5	163,3	40,4	30,0	14,6	21,0	19,1			
Cr	DP	827,9	868,6	886,0	867,4	818,3	646,1	559,3	487,3	283,7	194,1	172,9	156,3			
	M4E	1031,8	948,0	1038,2	1008,2	977,7	953,4	665,2	367,9	290,3	214,8	125,7	97,3			
Pb	DP	872,0	846,8	832,7	812,1	754,2	696,3	605,8	331,4	216,8	137,4	54,2	40,4			
	M4E	1039,7	969,1	962,8	971,0	883,2	797,9	687,2	279,6	204,3	155,6	98,0	67,2			
Cu	DP	904,7	871,6	861,0	566,5	414,7	327,4	217,4	72,6	47,9	32,1	16,0	11,6			
	M4E	1039,5	1030,0	999,8	750,0	474,3	345,0	160,6	84,9	29,7	36,7	33,0	31,7			
Ni	DP	785,5	811,9	862,2	623,9	504,0	263,0	238,2	112,3	94,5	83,9	82,5	68,7			
	M4E	1075,2	1091,7	1063,1	758,5	590,9	487,6	448,2	182,8	119,0	96,0	55,2	48,4			
Zn	DP	907,5	932,9	967,0	908,0	775,4	647,1	540,4	459,0	273,3	244,8	171,8	145,8			
	M4E	994,2	1044,8	1001,6	955,7	804,4	704,7	589,2	360,2	291,9	215,7	162,3	136,2			
Mn	DP	873,5	905,7	931,9	928,1	934,6	915,7	946,7	878,3	890,0	852,9	764,9	658,9	305,4	133,7	85,2
	M4E	1012,6	1115,5	1109,5	1124,5	1088,3	1131,5	1141,1	1128,4	1014,2	1022,0	918,2	789,6	473,8	217,1	92,8

O sombreado a cinza indica os valores de concentração de EPT a partir dos quais o IVP reduz mais de 50 %, comparativamente ao controle.



Dos sete EPTs em estudo, o Cd é o EPT que tem um efeito mais pronunciado na inibição do crescimento da parte aérea. Este elemento também tem um efeito negativo na massa fresca da raiz para concentrações baixas de Cd ( $\geq 50 \mu\text{M}$ , 37 %). O ensaio realizado com Pb manifesta o mesmo comportamento, mas para concentrações mais elevadas de contaminante ( $\geq 150 \mu\text{M}$ , 29 %) e o Cr também diminui a massa fresca da raiz quando estiveram presentes elevadas concentrações de elemento ( $1000 \mu\text{M}$ , 58 %), uma vez que ocorre um estímulo no crescimento das plântulas expostas a 50, 100 e  $150 \mu\text{M}$ .

O Cu, Ni e Zn têm um efeito semelhante na diminuição da massa fresca da parte aérea para concentrações superiores a  $50 \mu\text{M}$ . Contudo, para plântulas expostas a  $1000 \mu\text{M}$ , o Cu apresenta uma percentagem de inibição do crescimento superior (83 %), seguido do Ni (73 %) e Zn (63 %). O Cu é o único EPT que causa uma diminuição da massa fresca da raiz para todas as concentrações em estudo, até na mais baixa de  $5 \mu\text{M}$ . As raízes desta cultivar manifestam uma elevada sensibilidade para este elemento, em comparação com a parte aérea. O Ni estimula o crescimento, tanto da parte aérea como da raiz, para baixas concentrações de elemento ( $10 \mu\text{M}$ ). Após este estímulo, observa-se um efeito contrário na parte aérea ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ) e raiz ( $\geq 25 \mu\text{M}$ ). O Zn expõe o seu efeito tóxico para concentrações  $\geq 50 \mu\text{M}$  (parte aérea) e  $\geq 150 \mu\text{M}$  (raiz). O Mn apenas manifesta o seu efeito tóxico para elevadas concentrações na parte aérea ( $\geq 500 \mu\text{M}$ ) e na raiz ( $\geq 350 \mu\text{M}$ ), demonstrando um baixo nível de toxicidade deste elemento para as plantas de alface.

As plântulas de alface M4E (**Tabela 3.9-b**) também demonstram ser menos tolerantes à presença de Cd, manifestando uma diminuição da massa fresca da parte aérea ( $\geq 5 \mu\text{M}$ ) e raiz ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ) para concentrações mais baixas, quando comparado com os outros EPTs. Isto indica que a alface M4E é mais sensível à presença de Cd. O Pb e o Cr apresentam um efeito tóxico semelhante, na massa fresca da parte aérea e raiz, e isso foi notório através da observação da percentagem de inibição.

O efeito do Cu, Ni e Zn, na massa fresca da parte aérea, também é muito semelhante. A exposição ao Cu diminui a biomassa para concentrações mais baixas ( $\geq 25 \mu\text{M}$ ) que o Ni e Zn ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ). O Mn apenas manifesta o seu efeito negativo para elevadas concentrações ( $\geq 500 \mu\text{M}$ ). Em relação à massa fresca da raiz, o Cu e o Ni apresentam um comportamento adverso similar ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ), com a percentagem de inibição superior para o Cu, relativamente ao Ni, quando as plântulas são expostas a  $1000 \mu\text{M}$ . Esta cultivar parece ser menos tolerante à presença deste EPT. O Zn ( $\geq 5 \mu\text{M}$ ) e Mn ( $\geq 25 \mu\text{M}$ ) promoveram o crescimento das plântulas para baixas concentrações, manifestando o seu efeito negativo para concentrações mais



elevadas, 350 e 500  $\mu\text{M}$ , respetivamente. O Zn e o Mn foram os EPTs que apresentaram um menor efeito tóxico na raiz.

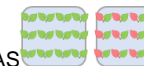
O IVP é um parâmetro importante que avalia o potencial desenvolvimento normal da plântula sob as condições experimentais estudadas. Como seria de esperar o vigor das plântulas diminui com o aumento da concentração de EPT (**Tabela 3.10**). O Cd e o Cu são os EPTs para os quais as duas cultivares de alface apresentam um menor vigor, o que reforça o que foi dito anteriormente.

Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores. Ahmad et al. (2013) verificaram que o vigor das plântulas de trigo diminuiu com o aumento da concentração de Cd (0-178  $\mu\text{M}$ ), sendo o índice de vigor menor na concentração mais elevada. Kabir et al. (2008) referiram que a aplicação de concentrações crescentes de Cd e Pb (10, 30, 50, 70  $\mu\text{M}$ ) diminuiu o índice de vigor de plântulas de *Thespesia populnea*. Este foi menor para a concentração mais elevada aplicada e o Cd foi o EPT que provocou uma maior diminuição no IVP. Prom-u-thai et al. (2012) verificaram que a presença de Zn (5000  $\mu\text{M}$ ) aumentou o crescimento e desenvolvimento das plântulas de arroz. No entanto, elevadas concentrações deste elemento, 10000 e 25000  $\mu\text{M}$ , diminuíram o vigor das plântulas. Shaikh et al. (2013) referiram que o índice de vigor das plântulas de trigo também diminuiu de forma significativa com a exposição a Cr (192  $\mu\text{M}$ ), Cd (89  $\mu\text{M}$ ), Mn (182  $\mu\text{M}$ ) e Zn (153  $\mu\text{M}$ ). Moosavi et al. (2012) demonstraram que o aumento da concentração de Cd e Pb (241, 965, 1689, 2413, 4826  $\mu\text{M}$ ) originou uma diminuição do vigor das plântulas de *Brassica napus*, *Triticum aestivum* e *Carthamus tinctorious*, sendo menor para as concentrações mais elevadas aplicadas.

Moosavi et al. (2012) também referiram que a inibição do crescimento da raiz devido à presença de elevadas concentrações de EPTs poderá ser uma das razões para a diminuição do vigor das plântulas. A exposição a concentrações tóxicas de elementos metálicos pode interromper a divisão celular e a replicação do RNA, o que pode bloquear o processo de reparação do DNA e outros processos fisiológicos vitais.

Na grande maioria dos estudos realizados em ensaios de germinação verifica-se que quantidades excessivas de EPTs levam a uma diminuição do crescimento das plântulas. Este efeito de diminuição da massa fresca da parte aérea e da raiz, à medida que se aumenta a concentração de EPT, tal como se verifica no presente estudo para as plântulas de alface, é uma tendência comum e tem sido verificado por vários autores (**Tabela 3.11**).



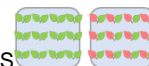
**Tabela 3.11** – Efeito da presença de EPTs na massa fresca, da parte aérea e da raiz, em diversos estudos realizados por outros autores.

Plântula	[EPT]	Tempo de exposição	Efeito do EPT	Referência Bibliográfica
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L. cv. Hwayeong)	200-1000 $\mu\text{M}$ Cd	4 dias	↓ significativa da biomassa; -não há crescimento em meios contaminados com 1000 $\mu\text{M}$ ; -pouco tolerante ao Cd.	(Ahsan et al., 2007a)
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L. cv. Malviya-36)	150 $\mu\text{M}$ Cd 600 $\mu\text{M}$ Pb Cd+Pb	8 a 16 dias	Cd e Pb: individualmente ou em combinação, causaram uma ↓ significativa da biomassa da parte aérea e raiz; -o efeito foi superior ao fim de 16 dias de crescimento: Cd: diminuição em 22 % e 44 % na MF das raízes e parte aérea, respectivamente; Pb: diminuição em 42 % e 17 % na MF das raízes e parte aérea, respectivamente; Cd+Pb: diminuição em 32 % e 40 % na MF das raízes e parte aérea, respectivamente.	(Srivastava et al., 2014)
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L. cv. DuoKang-1, Jing-9428, Jing-411, Jingdong-8, Zhongmai-8, Jingdong-11)	18, 36, 53, 71, 89 $\mu\text{M}$ Cd	6 dias	↓ biomassa das plântulas para todas as concentrações de Cd aplicadas.	(Liu et al., 2007)
Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> × <i>Sorghum sudanense</i> ) Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) Aveia ( <i>Avena sativa</i> )	100, 250, 500, 1000, 2000 mg $\text{kg}^{-1}$ solo Cr	7 dias	↓ significativa do crescimento da parte aérea para sorgo, trigo e aveia, a partir de concentrações $\geq 100$ , 1000 e 2000 mg $\text{kg}^{-1}$ , respectivamente; ↓ significativa do crescimento da raiz para sorgo ( $\geq 250$ mg $\text{kg}^{-1}$ ), trigo ( $\geq 500$ mg $\text{kg}^{-1}$ ) e aveia ( $\geq 1000$ mg $\text{kg}^{-1}$ ).	(Lopez-Luna et al., 2009)
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	Cd: 18, 36, 53, 71, 89 $\mu\text{M}$ Cr: 38, 79, 115, 154, 192 $\mu\text{M}$ Zn: 31, 61, 92, 122, 153 $\mu\text{M}$ Mn: 36, 73, 109, 146, 182 $\mu\text{M}$	8 dias	-o efeito tóxico dos EPTs: $\text{Zn} > \text{Cd} > \text{Mn} > \text{Cr}$ ; -há uma inibição do crescimento da parte aérea e raiz, com o aumento das concentrações dos EPTs; -a inibição foi superior na raiz do que na parte aérea; ↓ índice de tolerância; ↓ índice de vigor das plântulas.	(Shaikh et al., 2013)
Aipo ( <i>Apium graveolens</i> L. var. Pascal)	10-1000 $\mu\text{M}$ $\text{Cr}^{3+}$	15 dias	↓ crescimento da raiz (varia entre 51 e 72 %) para todas as $[\text{Cr}^{3+}]$ testadas.	(Scoccianti et al., 2006)

(continua)



Melão ( <i>Cucumis melo</i> L. cv. Barada)	48, 96, 192, 385, 577, 769, 962, 1154, 1346 $\mu$ M Cr	10 dias	↑ [Cr] provocou uma ↓ massa fresca da parte aérea e da raiz, ↓ índice de tolerância, ↓ taxa de crescimento das plântulas; -maior efeito nas plântulas do que no processo germinativo, devido à impermeabilidade do tegumento da semente e seletividade do embrião.	(Akinci e Akinci, 2010)
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L. cv. Achtar) Espinafre ( <i>Spinacia oleracea</i> L., var. "Géant d'hiver")	1500, 3000 e 15000 $\mu$ M Pb	30 dias	↓ massa fresca significativamente, em todas as modalidades de Pb aplicadas; -decréscimo foi mais acentuado para a concentração mais elevada (15000 $\mu$ M).	(Lamhamdi et al., 2013)
Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Falcon)	0, 362, 724, 1448 $\mu$ M Pb	30 dias	↓ significativa da massa fresca da parte aérea (362, 724, 1448 $\mu$ M); ↓ significativa da massa fresca da raiz (724, 1448 $\mu$ M ); ↓ índice de tolerância: 85, 64 e 50 devido à exposição com 362, 724, 1448 $\mu$ M Pb, respetivamente, por comparação com o controlo (100).	(Akinci et al., 2010)
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L. Var. - PBW 343)	79, 393, 787, 1574 $\mu$ M Cu	14 dias	↓ massa fresca das plântulas, com o aumento da [Cu], com diferenças significativas para todas as modalidades testadas.	(Singh et al., 2007)
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L. cv. Hwayeong)	200, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu$ M Cu	4 dias	↑ [Cu] provocou ↓ biomassa fresca das plântulas (500 e 1500 $\mu$ M); ↓ índice de tolerância.	(Ahsan et al., 2007b)
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L. cv. Pant-12)	200, 400 $\mu$ M Ni	20 dias	↓ biomassa da parte aérea (29 %) e da raiz (47 %), comparativamente ao controlo; ↓ vigor das plântulas.	(Maheshwari e Dubey, 2009)
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L. cv. 'Zyta')	50, 100 $\mu$ M Ni	1, 4 e 7 dias	↓ significativa da massa fresca da parte aérea de plântulas, em 17 % (50 $\mu$ M) e 47 % (100 $\mu$ M); - massa fresca da raiz foi a mais afetada, havendo um decréscimo em 47 % (50 $\mu$ M) e 64 % (100 $\mu$ M).	(Gajewska et al., 2012)
<i>Eucomis autumnalis</i> <i>Merwillia natalensis</i>	Cu: 16, 31, 79, 157, 315, 787 $\mu$ M Zn: 15, 31, 76, 153, 306, 765 $\mu$ M	21 dias	Zn: ↓ massa fresca das plântulas expostas a 153, 306 e 765 $\mu$ M; Cu: ↓ massa fresca das plântulas para as concentrações mais elevadas de Cu testadas (157, 315, 787 $\mu$ M, <i>E. autumnalis</i> ; 31, 79, 157, 315, 787 $\mu$ M, <i>M. natalensis</i> ).	(Street et al., 2007)
Fava ( <i>Vicia faba</i> L.)	10, 20, 40, 80, 120, 160 $\mu$ M Mn	15 dias	↓ crescimento da parte aérea e raiz; ↓ mais acentuada para a concentração mais elevada (160 $\mu$ M).	(Arya e Roy, 2011)



As plantas necessitam de diferentes nutrientes e água para se desenvolverem, mas quantidades excessivas podem originar toxicidade na raiz e parte aérea. Uma das razões que justificam uma diminuição no crescimento das plântulas pode ser uma diminuição das células meristemáticas e a diminuição de certas enzimas essenciais para o normal desenvolvimento das plântulas nesta fase inicial de desenvolvimento. As células armazenam e digerem as reservas alimentares que são convertidas em formas solúveis, que são posteriormente, transportadas até à raiz e parte aérea da plântula. Deste modo, quando a atividade das enzimas hidrolíticas (amilases e proteases) é afetada, o fornecimento das reservas alimentares pode ser comprometido, o que pode afetar diretamente o crescimento da plântula. Esta diminuição no crescimento deve-se ao efeito tóxico devido à acumulação de EPTs presentes no meio de crescimento das plântulas (Pandey e Sharma, 2002; Shafiq et al., 2008).

Liu et al. (2012) também referiram que a diminuição do crescimento da plântula pode ocorrer devido à inibição da divisão celular. Este processo é afetado pela presença de EPTs, que provocam a inibição direta ou indireta de processos fisiológicos como a respiração, fotossíntese (danos no PSII), balanço hídrico, atividade celular, resultando num fraco crescimento e diminuição da biomassa.

Aydin et al. (2012) também fazem referência no seu estudo que elevadas concentrações de EPTs pode inibir o crescimento das plântulas e vários processos bioquímicos, o que pode trazer consequências negativas. Os EPTs interagem com vários componentes celulares e interferem com as funções normais metabólicas, provocando danos celulares e até levar à morte dos organismos. As plântulas podem desenvolver diferentes mecanismos de defesa como a armazenagem destes EPTs nas raízes de forma a prevenir a sua translocação para outras partes da planta. Esta armazenagem pode afetar a estrutura normal da raiz e ter um maior efeito inibitório neste órgão do que noutras partes da plântula. Por este motivo, provavelmente, para ambas as cultivares em estudo neste trabalho, o crescimento da raiz é mais inibido que a parte aérea. Isto ocorre provavelmente devido às elevadas concentrações de EPTs no meio e esta diminuição do crescimento da raiz está associada ao contacto direto destes elementos com a raiz. Esta diminuição da biomassa da planta deve-se, por isso, em parte, à incapacidade das raízes em absorverem água e nutrientes do meio, o que tem impacto direto no desenvolvimento da parte aérea das plântulas.



### *Conclusões intercalares*

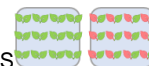
O crescimento da parte aérea e da raiz é influenciado pela presença de elevadas concentrações de elementos e para os vários EPTs estudados observam-se diferentes limiares de concentração que provocam uma diminuição significativa da massa fresca das plântulas de alface.

O tipo de EPT presente no meio é decisivo na resposta da plântula. Dos sete EPTs estudados, o Cd é o que tem um efeito mais pronunciado na inibição do crescimento da parte aérea e raízes. A alface DP demonstra ser menos tolerante à presença de Cd, em relação, ao Pb e Cr, enquanto a alface M4E é muito sensível à presença de Cd, especialmente, a parte aérea. A presença de Pb e Cr origina um comportamento muito semelhante na biomassa da raiz para ambas as cultivares, exceto para a cultivar DP, em que a presença de baixas concentrações estimulam o crescimento da raiz.

Os elementos essenciais, quando aplicados em quantidades excessivas podem promover efeitos tóxicos nesta fase inicial de desenvolvimento. O Cu é o elemento essencial que mais negativamente afeta a massa fresca da parte aérea e raiz das plântulas. A cultivar DP é mais sensível à sua presença, particularmente, as raízes. O efeito oposto é observado para a exposição com Mn, onde são necessárias concentrações mais elevadas para se verificar um efeito tóxico.

No presente estudo, observa-se que o IVP das plântulas diminui com o aumento da concentração de elemento aplicado. O Cd e o Cu são os EPTs que têm um efeito mais pronunciado no IVP, para ambas as cultivares. Em relação aos elementos não essenciais, o Cd provoca uma diminuição de 50 % no IVP, comparativamente ao controlo, com a exposição a 25 e 50  $\mu\text{M}$ , para DP e M4E, respetivamente. Tanto para Pb como para o Cr, os resultados são semelhantes, com reduções significativas no IVP após a exposição a 250  $\mu\text{M}$  (350  $\mu\text{M}$  para o Pb para a cultivar DP). Assim, o Cd tem claramente um efeito mais pronunciado no desenvolvimento das plântulas, do que o Pb ou Cr. Em relação aos elementos essenciais, o IVP é mais afetado pelo Cu, seguido por Ni, Zn e Mn, sendo este efeito semelhante para ambas as cultivares. No caso do Mn, apenas com uma concentração mais elevada de 2000  $\mu\text{M}$  é observada uma redução de 50 % no IVP em relação ao controlo.

O efeito tóxico dos EPTs afeta o crescimento das plântulas devido a efeitos negativos em vários processos metabólicos, resultando em menor elasticidade das paredes celulares, inibição da divisão celular, assim como suprimir a atividade de enzimas hidrolíticas.



#### 3.4.4. Comprimento da raiz

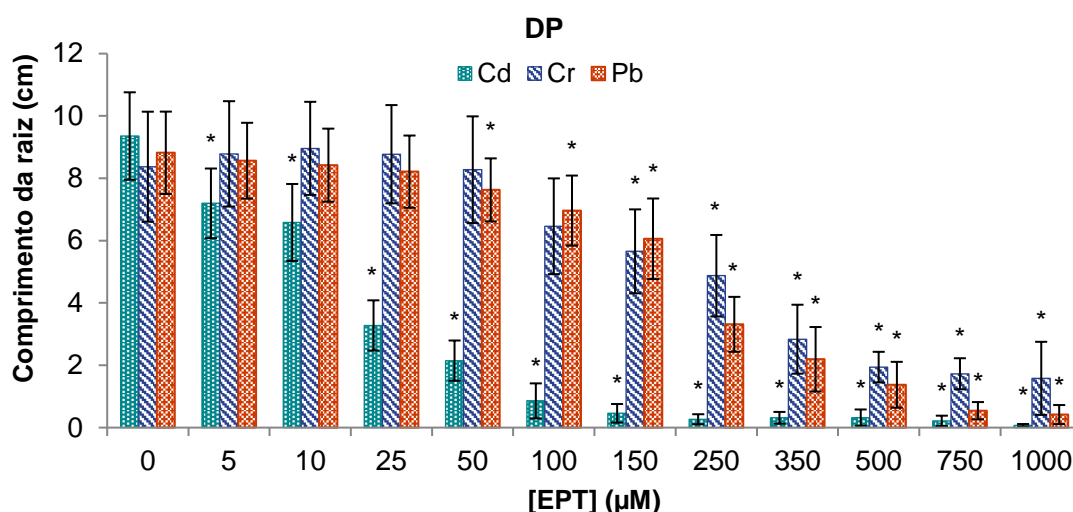
A raiz é muito utilizada para avaliar o nível de toxicidade dos EPTs (Yusuf et al., 2011), sendo a inibição do comprimento da raiz considerada uma das primeiras evidências do seu efeito tóxico (Visioli et al., 2014). Desta forma, o comprimento da raiz é um fator determinante para avaliar o efeito tóxico de um EPT, uma vez que é o primeiro órgão que está em contacto com o meio contaminado.

Nas seguintes figuras estão representados os resultados obtidos para o efeito dos EPTs, no comprimento das raízes, para a cultivar DP (**Figuras 3.20 e 3.21**) e M4E (**Figuras 3.22 e 3.23**).

Nas plântulas expostas ao Cd verifica-se uma diminuição gradual do comprimento da raiz com o aumento da concentração do elemento. Observam-se diferenças significativas no comprimento da raiz, em relação ao controlo, a partir da concentração de 5  $\mu\text{M}$ , para as duas cultivares em estudo. A partir de 250  $\mu\text{M}$  é evidente um decréscimo acentuado ( $< 0,50$  cm) para ambas as cultivares. Isto reforça o que foi dito anteriormente, demonstrando uma baixa tolerância das plântulas de alface à presença deste contaminante, no início do seu desenvolvimento. Nas duas cultivares de alface expostas ao Cr, com o aumento da concentração deste elemento, há um decréscimo significativo do comprimento da raiz, para concentrações  $\geq 150$   $\mu\text{M}$ .

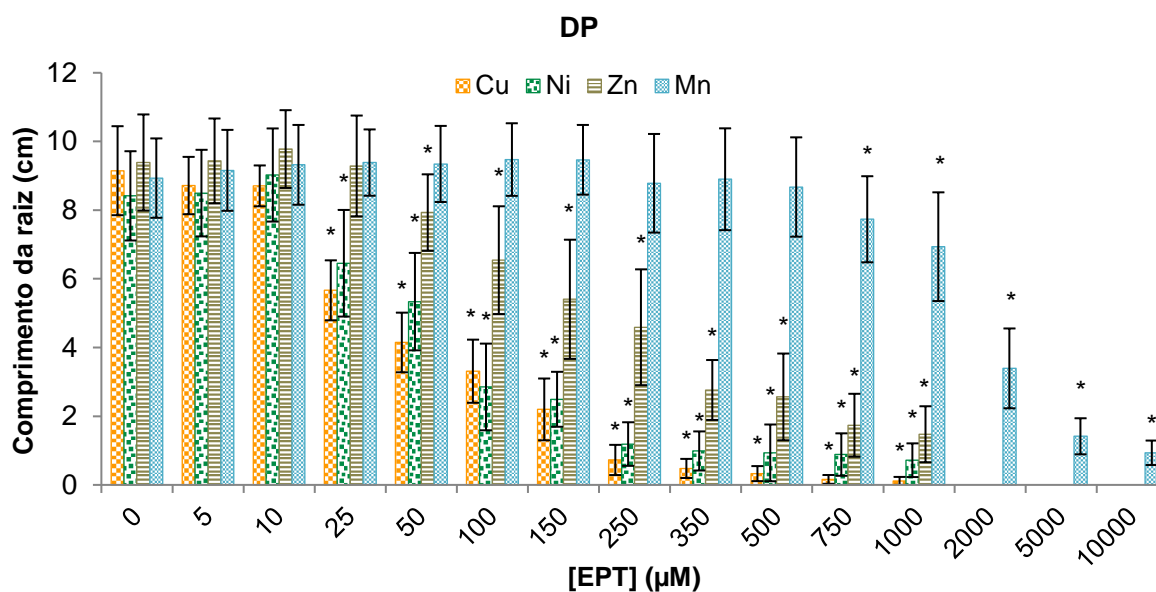
A exposição ao Pb permite verificar uma evidente diminuição significativa do comprimento da raiz a partir de 50  $\mu\text{M}$ , sendo este decréscimo acentuado para as concentrações mais elevadas (250 até 1000  $\mu\text{M}$ ). Nas concentrações 750 e 1000  $\mu\text{M}$ , o crescimento é inferior a 1 cm, para ambas as cultivares.

Relativamente ao Cu, para as duas cultivares de alface, existem diferenças significativas no comprimento da raiz, a partir da concentração de 25  $\mu\text{M}$ . Para as concentrações de 250, 350, 500, 750 e 1000  $\mu\text{M}$ , o comprimento da raiz é inferior a 1 cm. O comprimento da raiz das plântulas de alface, expostas a diferentes concentrações de Ni, apresenta a mesma tendência observada para os outros EPTs em estudo. Para este elemento, observa-se um decréscimo significativo a partir de 25  $\mu\text{M}$ , para ambas as cultivares. O comprimento da raiz é inferior a 2 cm para as concentrações mais elevadas de Ni utilizadas (250 até 1000  $\mu\text{M}$ ). Com a exposição a concentrações crescentes de Zn, há um decréscimo no comprimento das raízes, existindo diferenças significativas a partir de 50  $\mu\text{M}$ , por comparação com as plântulas controlo, para as duas cultivares. No caso da exposição a Mn existem diferenças no comportamento das duas cultivares de alface.



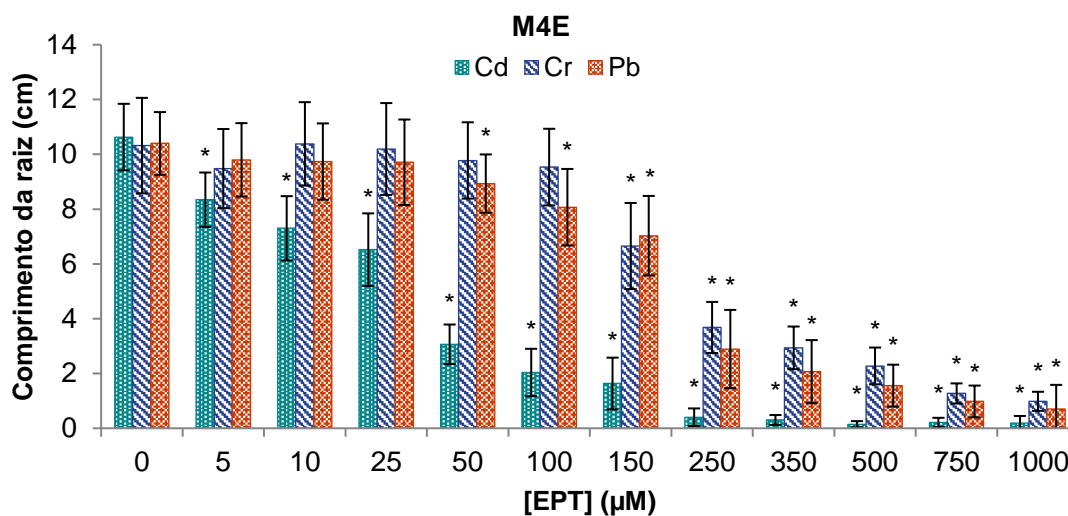
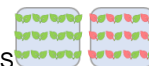
**Figura 3.20** – Comprimento da raiz das plântulas de alface DP, submetidas a diferentes concentrações de Cd, Cr ou Pb, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=60).



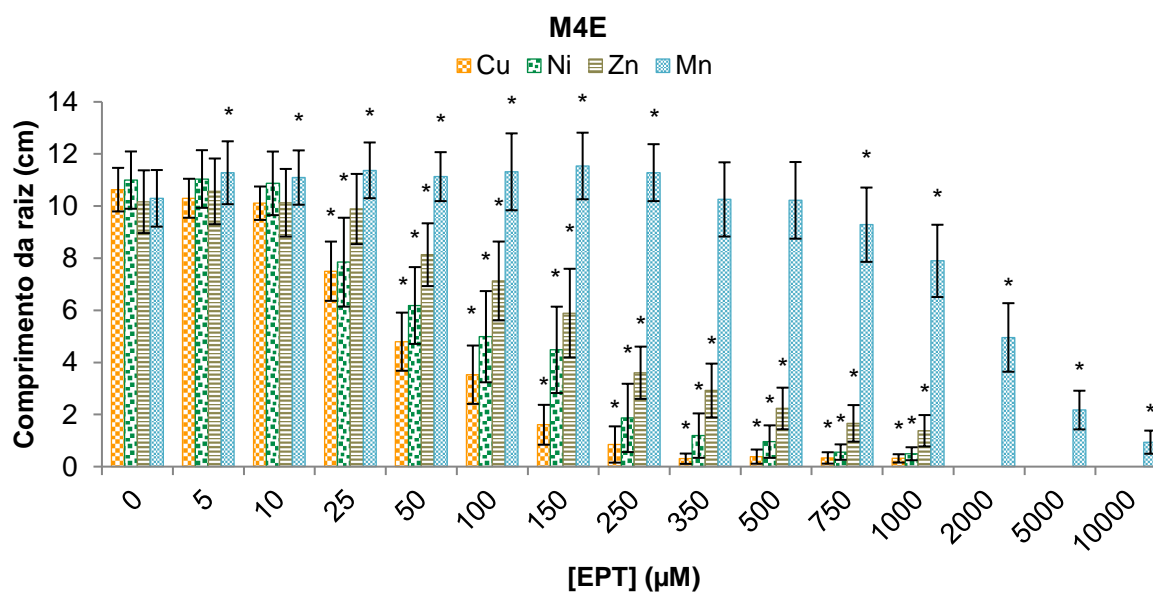
**Figura 3.21** – Comprimento da raiz das plântulas de alface DP, submetidas a diferentes concentrações de Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=60).



**Figura 3.22** – Comprimento da raiz das plântulas de alfaca M4E, submetidas a diferentes concentrações de Cd, Cr ou Pb, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=60).



**Figura 3.23** – Comprimento da raiz das plântulas de alfaca M4E, submetidas a diferentes concentrações de Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=60).





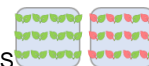
Em ambas as cultivares, observa-se um decréscimo significativo do comprimento da raiz a partir de 750  $\mu\text{M}$ , sendo mais acentuado para 2000, 5000 e 10000  $\mu\text{M}$  de Mn. Na alface M4E há um estímulo do crescimento com a exposição de 5  $\mu\text{M}$  até 250  $\mu\text{M}$  de Mn. Para 5 e 25  $\mu\text{M}$ , registam-se os maiores valores médios de comprimento de raiz, 11,28 cm e 11,37 cm, respetivamente, sendo concordante com os resultados obtidos para a massa fresca da raiz.

Na **Tabela 3.12** encontram-se os índices de inibição do comprimento da raiz e na **Tabela 3.13** apresentam-se os índices de tolerância da raiz (ITR), para as duas cultivares de alface expostas a diferentes concentrações de EPTs.

As cultivares DP e M4E apresentam o mesmo comportamento para o índice de inibição do comprimento da raiz (**Tabela 3.12**). O Cd é o único elemento que manifesta o seu efeito tóxico no comprimento da raiz, para concentrações mais baixas de contaminante ( $\geq 5$   $\mu\text{M}$ ). A exposição a 1000  $\mu\text{M}$  origina uma inibição do comprimento da raiz em 99 % e 98 %, para a alface DP e M4E, respetivamente. Isto reforça o que foi dito anteriormente, demonstrando que as plântulas de alface são pouco tolerantes à presença de Cd nesta fase inicial de desenvolvimento. A exposição a Cr ( $\geq 150$   $\mu\text{M}$ ), Pb ( $\geq 50$   $\mu\text{M}$ ), Cu ( $\geq 25$   $\mu\text{M}$ ), Ni ( $\geq 25$   $\mu\text{M}$ ), Zn ( $\geq 50$   $\mu\text{M}$ ) e Mn ( $\geq 750$   $\mu\text{M}$ ), leva a uma diminuição significativa no comprimento da raiz, com índices de inibição próximos de 90 %, evidenciando que esta variável é bastante afetada pela presença destes elementos.

Apesar de existir um ligeiro aumento na massa fresca da raiz com 10  $\mu\text{M}$  de Ni, nas plântulas de alface DP (**Figura 3.17**), não se observam efeitos significativos no comprimento da raiz. Isto demonstra que houve uma alteração na morfologia da raiz, ou seja, uma raiz mais curta e ramificada. Na alface M4E existe um estímulo no comprimento da raiz com a exposição de 5 a 150  $\mu\text{M}$  de Mn, o que está de acordo com os resultados obtidos para a massa fresca da raiz (**Figura 3.19**).

O ITR permite verificar que a exposição à concentração mais elevada de Cd (DP: 0,8 %; M4E: 2,1 %) e Cu (DP: 1,3 %; M4E: 3,5 %) origina uma menor tolerância das raízes das plântulas de alface. O Mn é o elemento que tem menos efeito no comprimento da raiz, sendo necessário aumentar a concentração aplicada 10 vezes para se obter um resultado semelhante aos dos outros EPTs (**Tabela 3.13**).



**Tabela 3.12** – Índice de inibição do comprimento da raiz das duas cultivares de alface, sujeitas a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento.

Índice de inibição do comprimento da raiz (%)																		
		Concentração de EPT (µM)																
Cultivar	EPT	0	5	10	25	50	100	150	250	350	500	750	1000	2000	5000	10000		
DP	Cd	0	23	30	65	77	91	95	97	97	97	98	99					
	Cr	0	-5	-7	-5	1	23	32	42	66	77	79	81					
	Pb	0	3	5	7	14	21	31	62	75	84	94	95					
	Cu	0	5	5	38	55	64	76	92	95	96	98	99					
	Ni	0	-1	-7	23	37	66	70	86	88	89	90	91					
	Zn	0	0	-4	1	16	30	42	51	71	73	81	84					
	Mn	0	-3	-4	-5	-5	-6	-6	2	0	3	13	22	62	84	90		
M4E	Cd	0	22	31	39	71	81	85	96	97	99	98	98					
	Cr	0	8	-1	1	5	8	36	64	72	78	88	90					
	Pb	0	6	6	7	14	22	32	72	80	85	91	93					
	Cu	0	3	5	29	55	67	85	92	97	96	97	97					
	Ni	0	0	1	29	44	55	59	83	89	91	95	96					
	Zn	0	-4	0	3	20	30	42	65	71	78	84	86					
	Mn	0	-10	-8	-10	-8	-10	-12	-10	0	1	10	23	52	79	91		

O **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.

**Tabela 3.13** – Índice de tolerância da raiz para as duas cultivares de alface, sujeitas a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn ou Mn, ao fim de 10 dias de tratamento.

		ITR (%)														
		Concentração de EPT (µM)														
EPT	Cultivar	0	5	10	25	50	100	150	250	350	500	750	1000	2000	5000	10000
Cd	DP	100,0	76,9	70,4	35,1	23,0	9,2	4,9	2,9	3,4	3,4	2,3	0,8			
	M4E	100,0	89,2	78,0	69,7	32,8	21,8	17,5	4,3	3,2	1,6	2,3	2,1			
Cr	DP	100,0	104,9	107,0	104,8	98,8	77,2	67,6	58,2	33,9	23,2	20,6	18,9			
	M4E	100,0	113,2	124,0	121,8	116,8	113,9	79,5	43,9	35,1	27,2	15,2	11,8			
Pb	DP	100,0	97,1	95,5	93,1	86,5	79,0	68,7	37,6	24,9	15,6	6,1	4,7			
	M4E	100,0	111,1	110,4	110,1	101,3	91,5	79,7	32,8	23,4	17,6	11,1	8,0			
Cu	DP	100,0	95,3	95,2	61,9	45,3	36,2	24,0	7,9	5,2	3,6	1,8	1,3			
	M4E	100,0	112,6	110,5	82,0	52,4	38,6	17,6	9,3	3,3	4,2	3,6	3,5			
Ni	DP	100,0	101,0	107,2	76,7	63,4	33,9	29,6	14,1	11,7	11,1	10,5	8,5			
	M4E	100,0	131,2	129,2	93,2	73,5	59,2	53,3	22,2	14,1	11,4	6,6	5,9			
Zn	DP	100,0	100,5	104,2	98,9	84,5	69,7	57,6	48,9	29,4	27,3	18,5	15,7			
	M4E	100,0	112,5	107,9	105,3	86,6	75,9	62,8	38,4	31,1	23,8	17,7	14,7			
Mn	DP	100,0	102,5	104,3	105,1	104,6	106,0	106,0	98,3	99,6	97,1	86,6	77,6	38,0	15,8	10,5
	M4E	100,0	126,3	124,2	127,3	124,6	126,7	129,2	126,3	114,8	114,4	103,9	88,4	55,5	24,3	10,5

O **sombreado a cinza** indica os valores de concentração de EPT a partir dos quais o IVP reduz mais de 50 %, comparativamente ao controle.

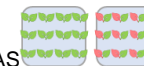


Outros estudos reforçam o que é observado para as plântulas de alface. Ahsan et al. (2007b) verificaram que o ITR diminuiu, em sementes de arroz, com o aumento da exposição a 200-2000  $\mu\text{M}$  Cu. Akinci e Akinci (2010) também observaram que nas plântulas de melão, o ITR diminuiu com o aumento da concentração de Cr (48, 96, 192, 385, 577, 769, 962, 1154 e 1346  $\mu\text{M}$  Cr). Kabir et al. (2008) referiram que as plântulas demonstraram uma baixa tolerância a 70  $\mu\text{M}$  de Pb e Cd. Mahmood et al. (2007) referiram que o aumento de Cu, Pb e Zn (1, 5 e 10  $\mu\text{M}$ ) teve efeitos adversos significativos no ITR, nas plântulas de milho, arroz e trigo, sendo menos tolerantes à presença de Cu. Shafiq et al. (2008) demonstraram que concentrações crescentes de Cd (222, 444, 667, 890  $\mu\text{M}$ ) e Pb (121, 241, 362, 483  $\mu\text{M}$ ) diminuíram a tolerância das plântulas de *Cassia siamea*, sendo evidente que a presença de Cd teve um efeito mais pronunciado, tal como se verifica nas plântulas de alface em estudo.

Na **Tabela 3.14** apresentam-se os resultados obtidos por outros autores sobre o efeito da presença dos vários EPTs no comprimento da raiz de diversas plântulas.

O presente estudo indica que o comprimento da raiz das plântulas de alface é mais sensível à presença de EPTs do que o processo germinativo (Di Salvatore et al., 2008; Marichali et al., 2014), reforçando o que foi descrito anteriormente. Para além de os EPTs afetarem diferentes processos metabólicos (Mourato et al., 2012), este decréscimo no comprimento da raiz pode estar relacionado com a interferência dos EPTs na divisão celular (Jiang et al., 2000), proliferação e alongação celular (Michael e Krishnaswamy, 2011), perda da viabilidade celular da ponta da raiz (Finger-Teixeira et al., 2010) ou com a armazenagem de nutrientes na formação do embrião, podendo alterar a mobilização dos nutrientes (Karmous et al., 2011; Sfaxi-Bousbih et al., 2010a; Sfaxi-Bousbih et al., 2010b), nomeadamente, a atividade das amilases (Kranner e Colville, 2011; Sfaxi-Bousbih et al., 2010b) e proteases (Karmous et al., 2011; Mihoub et al., 2005), tal como referido anteriormente.

Kabir et al. (2008) suportam o que foi dito anteriormente referindo que a diminuição do comprimento da raiz devido à presença de EPTs, pode dever-se a uma diminuição na divisão celular nas zonas meristemáticas da raiz. Isto ocorre devido à acumulação de EPTs na raiz, reduzindo a taxa mitótica nas zonas meristemáticas, especialmente pelo bloqueio da metafase. Estas poderão ser algumas das razões que explicam a diminuição do comprimento da raiz verificado nas plântulas de alface.

**Tabela 3.14** – Efeito da presença de EPTs no comprimento da raiz em diversos estudos realizados por outros autores.

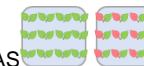
Plântula	[EPT]	Tempo de exposição	Efeito do EPT	Referência Bibliográfica
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L. cv. DuoKang-1, Jing-9428, Jing-411, Jingdong-8, Zhongmai-8, Jingdong-11)	18, 36, 53, 71, 89 $\mu\text{M}$ Cd	6 dias	↓ comprimento da raiz.	(Liu et al., 2007)
Rúcula ( <i>Eruca sativa</i> )	Cd: 0,2; 0,4; 0,8; 1,3; 2,2; 4,4; 6,7; 8,9 $\mu\text{M}$ Cu: 0,3; 0,8; 1,6; 2,4; 3,9; 7,9; 11,8; 15,7 $\mu\text{M}$ Ni: 0,4; 0,9; 1,7; 2,6; 4,3; 8,5; 12,8; 17,0 $\mu\text{M}$ Pb: 0,1; 0,2; 0,5; 0,7; 2,4; 3,6; 4,8 $\mu\text{M}$ Zn: 0,4; 0,8; 1,5; 2,3; 3,8; 7,6; 11,5; 15,3 $\mu\text{M}$	72 horas	Cu: ↓ comprimento da raiz para concentrações > 0,8 $\mu\text{M}$ ; Cu mais eficaz na inibição do crescimento das plântulas; Zn: elevada tolerância à presença de Zn; sem efeito de inibição no crescimento da raiz (11,5; 15,3 $\mu\text{M}$ ); Pb: raízes não cresceram em meios contaminados com concentrações > 1,0 $\mu\text{M}$ ; Ni: ↓ comprimento da raiz em 50 % para concentrações > 0,4 $\mu\text{M}$ ; Cd: ↓ comprimento da raiz completamente inibido para 1,3-8,9 $\mu\text{M}$ .	(Ozdener e Kutbay, 2009)
Rúcula ( <i>Eruca sativa</i> )	variam conforme o EPT: 50-5000 $\mu\text{M}$ Cu, Ni, Zn, Hg, Cr, Pb, Cd	7-8 dias	- todos os EPTs, exceto o Zn e Ni: ↓ comprimento da raiz, ↓ massa fresca da plântula e o processo germinativo foi sempre o menos afetado; - o crescimento da plântula foi estimulado pela presença de Ni (> 1000 $\mu\text{M}$ ) e Zn (2-5000 $\mu\text{M}$ ); - tolerante/moderadamente tolerante para Cu, Hg, Cr, e Cd e muito tolerante à presença de Pb, Ni e Zn.	(Zhi et al., 2015)
Ervilha ( <i>Pisum sativum</i> L.)	125, 250, 500, 1000 $\mu\text{M}$ Cd	6 horas	↓ comprimento da raiz	(Siddiqui et al., 2009)
Alface ( <i>Lactuca sativa</i> var. Batavia)	25, 35 e 50 $\mu\text{M}$ Cd, Cr	alface/acetga: 12 dias	Cd: ↓ comprimento da raiz em acetga (57%), alface (89 %) e espinafre (56 %); - uma relação entre a concentração de Cd e o nível de inibição do crescimento, referindo que esta foi a variável mais afetada pela presença deste elemento em alface e acetga;	(Bautista et al., 2013)
Acetga ( <i>Beta vulgaris</i> var. cicla 'White Ribbed')		espinafre: 15 dias	Cr: sem efeitos tão negativos; em alface estimulou o crescimento da raiz com 35 $\mu\text{M}$ ; o comprimento da raiz de espinafre foi mais suscetível ao Cr.	
Espinafre ( <i>Spinacia oleracea</i> Hib. 424)				
<i>Eucomis autumnalis</i> <i>Merwillia natalensis</i> <i>Bowiea volubilis</i>	4,4; 8,9; 17,8 $\mu\text{M}$ Cd	21 dias	<i>E. autumnalis</i> : sem efeito no comprimento da raiz (ao fim de 45 dias de exposição); <i>M. natalensis</i> : ↓ comprimento da raiz $\geq 8,9 \mu\text{M}$ ; <i>B. volubilis</i> : ↓ comprimento da raiz $\geq 4,4 \mu\text{M}$ .	(Street et al., 2007)
Pepino ( <i>Cucumis sativus</i> L. cv. Aodai)	100, 400, 1000 $\mu\text{M}$ Cd	10 dias	↓ significativa do comprimento da raiz em 83 %, nas plântulas expostas a 100 $\mu\text{M}$ e, em 97-98 %, para as concentrações mais elevadas de Cd (400 e 1000 $\mu\text{M}$ ).	(Gonçalves et al., 2007)

(continua)



<i>Cassia siamea</i>	Cd: 222, 445, 667, 890 $\mu\text{M}$ Pb: 121, 241, 362, 483 $\mu\text{M}$	10 dias	-a exposição a 222- 890 $\mu\text{M}$ de Cd $\downarrow$ significativa comprimento da raiz; -a exposição a 241, 362 e 483 $\mu\text{M}$ de Pb: $\downarrow$ significativa no comprimento da raiz.	(Shafiq et al., 2008)
<i>Suaeda salsa</i>	0,9; 4,4; 8,9; 17,8; 35,6; 53,4 $\mu\text{M}$ Cd	7 dias	$\downarrow$ comprimento da raiz o Cd; -o efeito do EPT foi mais evidente no crescimento da raiz ( $\geq 0,9 \mu\text{M}$ ) do que na parte aérea ( $\geq 8,9 \mu\text{M}$ ).	(Liu et al., 2012)
Alface (var. trocadero) Brócolo (var. italica) Tomate (var. Principe borghese) Rabanete (var. saxa).	2-1024 $\mu\text{M}$ Cd, Pb, Ni, Cu	Alface, brócolo e rabanete: 72 horas Tomate: 96 horas	Cd: $\downarrow$ significativa do comprimento da raiz de plântulas de alface ( $\geq 128 \mu\text{M}$ ), brócolo ( $\geq 256 \mu\text{M}$ ), tomate ( $\geq 128 \mu\text{M}$ ); sem diferenças significativas nas raízes de rabanete; Pb: $\downarrow$ significativa do comprimento da raiz de plântulas de alface, brócolo e tomate ( $\geq 256 \mu\text{M}$ ), e sem efeito significativo nas raízes de rabanete; Ni: $\downarrow$ significativa do comprimento da raiz de plântulas de alface ( $\geq 32 \mu\text{M}$ ), brócolo ( $\geq 256 \mu\text{M}$ ), tomate ( $\geq 256 \mu\text{M}$ ) e rabanete ( $\geq 512 \mu\text{M}$ ); Cu: $\downarrow$ significativa do comprimento da raiz de plântulas de alface ( $\geq 64 \mu\text{M}$ ), brócolo ( $\geq 4 \mu\text{M}$ ), tomate ( $\geq 256 \mu\text{M}$ ) e rabanete ( $\geq 1024 \mu\text{M}$ ); -alface foi mais sensível: Ni>Cu>Cd>Pb; a alface foi a espécie mais sensível ao Cd, Pb e Ni; -Cd, Ni, Cu: nas concentrações mais elevadas não há crescimento da raiz.	(Di Salvatore et al., 2008)
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L. cv. Achtar)	150, 300, 1500, 3000 $\mu\text{M}$ Pb	6 dias	-o comprimento das raízes foi muito sensível ao efeito do Pb, a exposição a 3000 $\mu\text{M}$ provocou uma $\downarrow$ comprimento da raiz (2,3 cm), em relação ao controle (7,7 cm).	(Lamhamdi et al., 2011)
<i>Thespesia populnea</i>	10, 30, 50, 70 $\mu\text{M}$ Pb	12 dias	$\downarrow$ significativa no comprimento da raiz ( $< 1 \text{ cm}$ ) das plântulas submetidas a todas as concentrações de Pb, relativamente ao controle ( $\approx 2,49 \text{ cm}$ ), sendo essa diminuição mais acentuada nas concentrações mais elevadas.	(Kabir et al., 2008)
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L. Var. - PBW 343)	79, 393, 787, 1574 $\mu\text{M}$ Cu	14 dias	$\downarrow$ comprimento da raiz exposta a diferentes [Cu], havendo diferenças significativas em todas as concentrações utilizadas.	(Singh et al., 2007)
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L. Yangmai 158)	3000, 5000, 7000, 9000 $\mu\text{M}$ Cu	48 horas	$\downarrow$ comprimento das raízes foi fortemente inibido pela presença de Cu, existindo uma diminuição significativa deste crescimento com a exposição a 3000 e 5000 $\mu\text{M}$ ; -nas concentrações mais elevadas de Cu (7000 e 9000 $\mu\text{M}$ ), não ocorreu crescimento da raiz.	(Zhang et al., 2008)
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) Pepino ( <i>Cucumis sativus</i> cv. Beit alpha)	500-8000 $\mu\text{M}$ Cd, Cu, Pb, Zn	72 horas	$\downarrow$ comprimento da raiz vs $\uparrow$ [EPTs]; -Cd: nas plântulas de trigo (2000-8000 $\mu\text{M}$ ) e pepino (3000 e 8000 $\mu\text{M}$ ), não ocorreu crescimento da raiz; Cu: nas plântulas de trigo (1500-8000 $\mu\text{M}$ ) e pepino (2500 e 8000 $\mu\text{M}$ ), não ocorreu crescimento da raiz; Pb/Zn: $\downarrow$ gradual do comprimento da raiz; -há um $\downarrow$ acentuada do comprimento mesmo para as concentrações mais baixas.	(Munzuroglu, 2002)

(continua)



Ervilha ( <i>Pisum sativum</i> var. douce Provence)	5000 µM Cd	4 dias	↓ acentuada do comprimento da raiz.	(Mihoub et al., 2005).
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L. cv. Zyta)	10, 200 µM Ni	3,6,9 dias	-10 µM: sem efeito significativo no crescimento das raízes; -200 µM: inibição significativa no comprimento da raiz.	(Gajewska et al., 2006)
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L. cv. Pant-12)	200, 400 µM Ni	15 dias	↓ comprimento das raízes; -diferenças significativas para 200 e 400 µM.	(Maheshwari e Dubey, 2009)
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L. cv. Zyta)	100, 200 µM Ni	6 dias	100, 200 µM: ↓ crescimento das raízes em 37 e 53 %, respectivamente.	(Gajewska e Sklodowska, 2008)
<i>Brassica juncea</i> L. cv. T-59	50, 100 µM Ni	10 dias	↓ comprimento da raiz.	(Alam et al., 2007)
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L. cv. Zyta)	75 µM Cu, Cd, Ni	7 dias	↓ significativamente o comprimento da raiz em 91 % (Cu), 63 % (Cd) e 72 % (Ni); -maior sensibilidade da raiz relativamente à parte aérea.	(Gajewska e Sklodowska, 2010)
Rabanete ( <i>Raphanus sativus</i> c.v. Early menu)	100, 200, 500, 1000 µM Ni	14 dias	Ni: ↓ significativa do comprimento da raiz, existindo diferenças significativas para 500 e 1000 µM.	(Yadav et al., 2009)
Pepino ( <i>Cucumis sativus</i> L. Beith Alpha F1)	Cu: 630, 1259, 2518, 3777, 5036, 10072 µM Zn: 611, 1224, 2447, 3671, 4894, 9789 µM	21 dias	↓ comprimento da raiz vs ↑ [Cu], [Zn]; Zn: taxa mínima de inibição 1224 µM; Cu: taxa máxima de inibição para 10072 µM; -efeito inibitório superior do Cu.	(Aydin et al., 2012)
Milho ( <i>Z. mays</i> L. cv. NK-199) Couve ( <i>Brassica oleracea</i> var. capitata L. cv. Golden Acre)	1,5x 10 <sup>-4</sup> -15,3 µM Zn	7 dias	↓ significativa do comprimento da raiz nas concentrações mais elevadas testadas (7,6 e 15,3 µM).	(Pokhrel e Dubey, 2013).
<i>Vigna radiata</i> L.	91, 182, 455, 910, 1820 µM Mn	7 dias	↓ comprimento da raiz vs ↑ [Mn].	(Mumthas et al., 2010)
<i>Atriplex halimus</i> <i>Salicornia ramosissima</i> (espécies halófitas)	10-2000 µM Cu, Mn, Ni, Zn	30 dias	↓ significativa no comprimento da raiz com a exposição a concentrações crescentes de Cu, Ni, Zn e Mn; - <i>A. halimus</i> : Cu: ≥250 µM; Ni: ≥100 µM; Zn: ≥250 µM; Mn: estímulo do comprimento da raiz (10 µM); com a exposição a 250-2000 µM, o comprimento da raiz foi significativamente reduzido. - <i>S. ramosissima</i> : Cu: ≥1000 µM; Ni: estímulo do comprimento da raiz (10 µM), mas [Ni] ≥100 µM ↓ comprimento da raiz; Zn: ≥1000, 2000 µM; Mn: estímulo do comprimento da raiz (10 µM).	(Marquez-Garcia et al., 2013)



### *Conclusões intercalares*

O comprimento da raiz diminui com a exposição a concentrações elevadas de todos os EPTs utilizados, sendo mais pronunciada para as concentrações mais elevadas testadas. Ambas as cultivares apresentam o mesmo comportamento na diminuição do comprimento da raiz que é acompanhada, como seria de esperar, pela diminuição da sua massa fresca.

Os resultados obtidos para o ITR vêm confirmar a ideia de que o Cd e Cu têm um maior efeito tóxico nas plântulas de alface. Se se comparar as duas cultivares é possível verificar que a alface DP é menos tolerante que a cultivar M4E, com exceção do Cr, onde se verifica um efeito oposto no ITR. Ambas as cultivares são bastante tolerantes ao Mn e uma redução de 50 % é obtida para a mesma concentração de Pb e Zn (250  $\mu\text{M}$ ), porém os valores de ITR diminuíram muito mais com a exposição a Pb em comparação com Zn.

O tipo de EPT afeta a resposta da raiz face ao efeito tóxico. O Cd e o Cu são os EPTs que causam a maior inibição do comprimento da raiz, o que está consistente com os resultados obtidos previamente. O Mn é o EPT que mostra ter um efeito menor no comprimento da raiz das plântulas de alface que só se manifesta para valores de concentração bastante elevados.

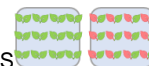
#### **3.4.5. Absorção e acumulação do EPT**

Nas **Figuras 3.24 e 3.25** está representado o teor de EPTs que é acumulado na parte aérea das plântulas de alface DP e M4E, respetivamente. Como seria de esperar existe uma tendência para uma acumulação de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn ou Mn na parte aérea das plântulas proporcional à quantidade de elemento aplicada.

Para ambas as cultivares, para as concentrações mais baixas (5 e 10  $\mu\text{M}$ ), os três EPTs mais absorvidos pelas plantas são o Mn, Zn e Cd, sempre com concentrações absorvidas superiores a 100  $\text{mg kg}^{-1}$  MS (todos os outros EPTs têm concentrações inferiores a este valor). Para concentrações de EPTs entre 25 e 100  $\mu\text{M}$ , os elementos que são mais acumulados são o Cd, Ni, Zn, Pb e Mn. Para concentrações entre 150-500  $\mu\text{M}$  (DP) e 100-500  $\mu\text{M}$  (M4E), o elemento mais absorvido é o Mn. Até nas concentrações mais elevadas absorvidas pela plântula, os efeitos tóxicos, descritos anteriormente, são leves, comparativamente, a outros EPTs como o Cd, confirmando a baixa toxicidade do Mn nas plântulas de alface.

Nas duas concentrações mais elevadas (750 e 1000  $\mu\text{M}$ ), o Cd é o EPT presente em maior quantidade na parte aérea das plântulas de alface. Isto demonstra a elevada mobilidade deste

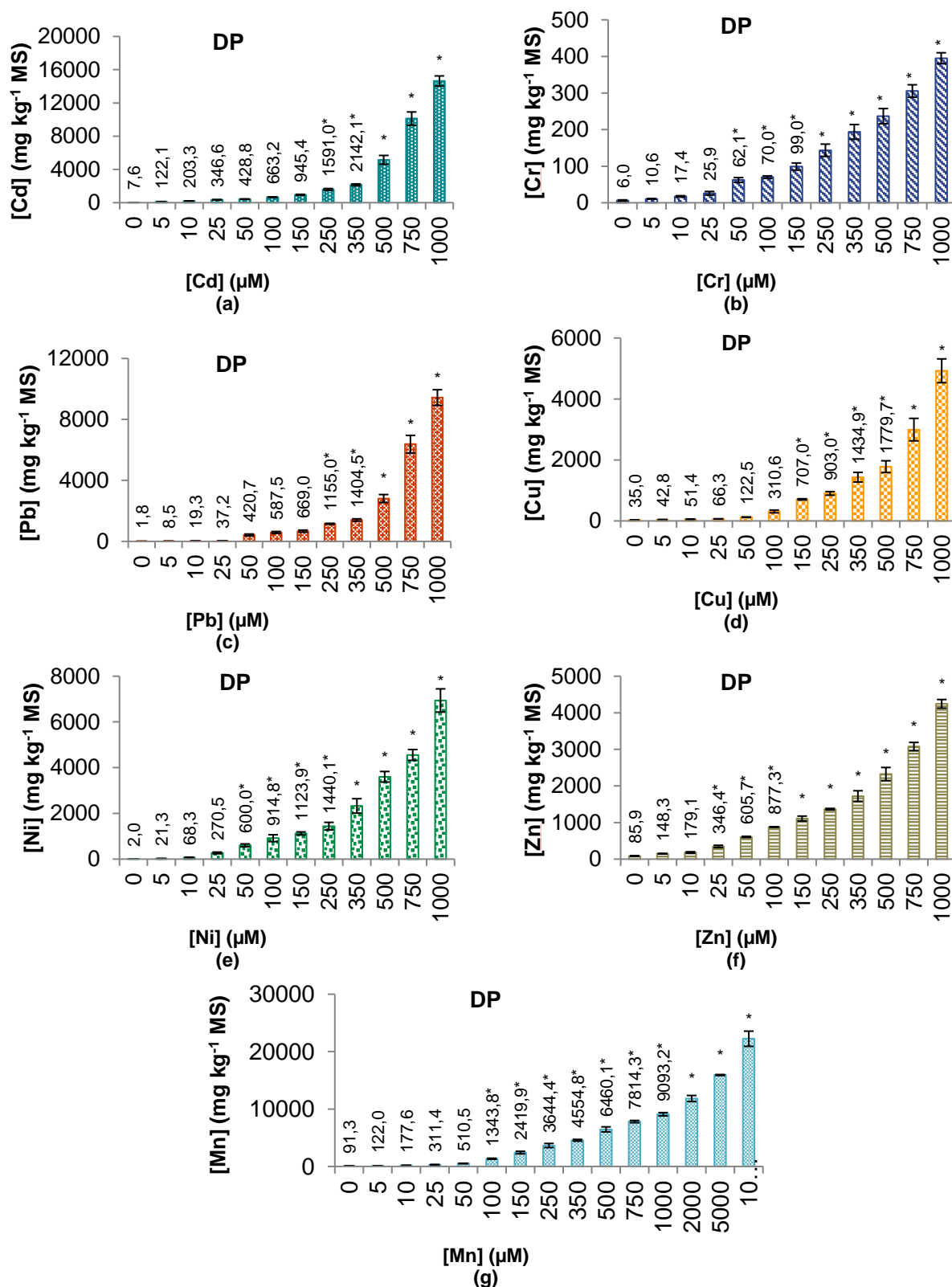




elemento na plântula e é também um resultado da quebra no sistema de defesa da plântula. Gonçalves et al. (2007) referiram que a presença de concentrações crescentes de Cd (100, 400 1000  $\mu\text{M}$ ) aumentaram de forma significativa a concentração deste elemento na parte aérea das plântulas. Gajewska e Sklodowska (2010) descreveram que o aumento mais acentuado no teor de EPTs na plântula foi obtido para o tratamento com Cd, havendo um aumento de 1240 e 1900 vezes para a parte aérea e raiz, respectivamente.

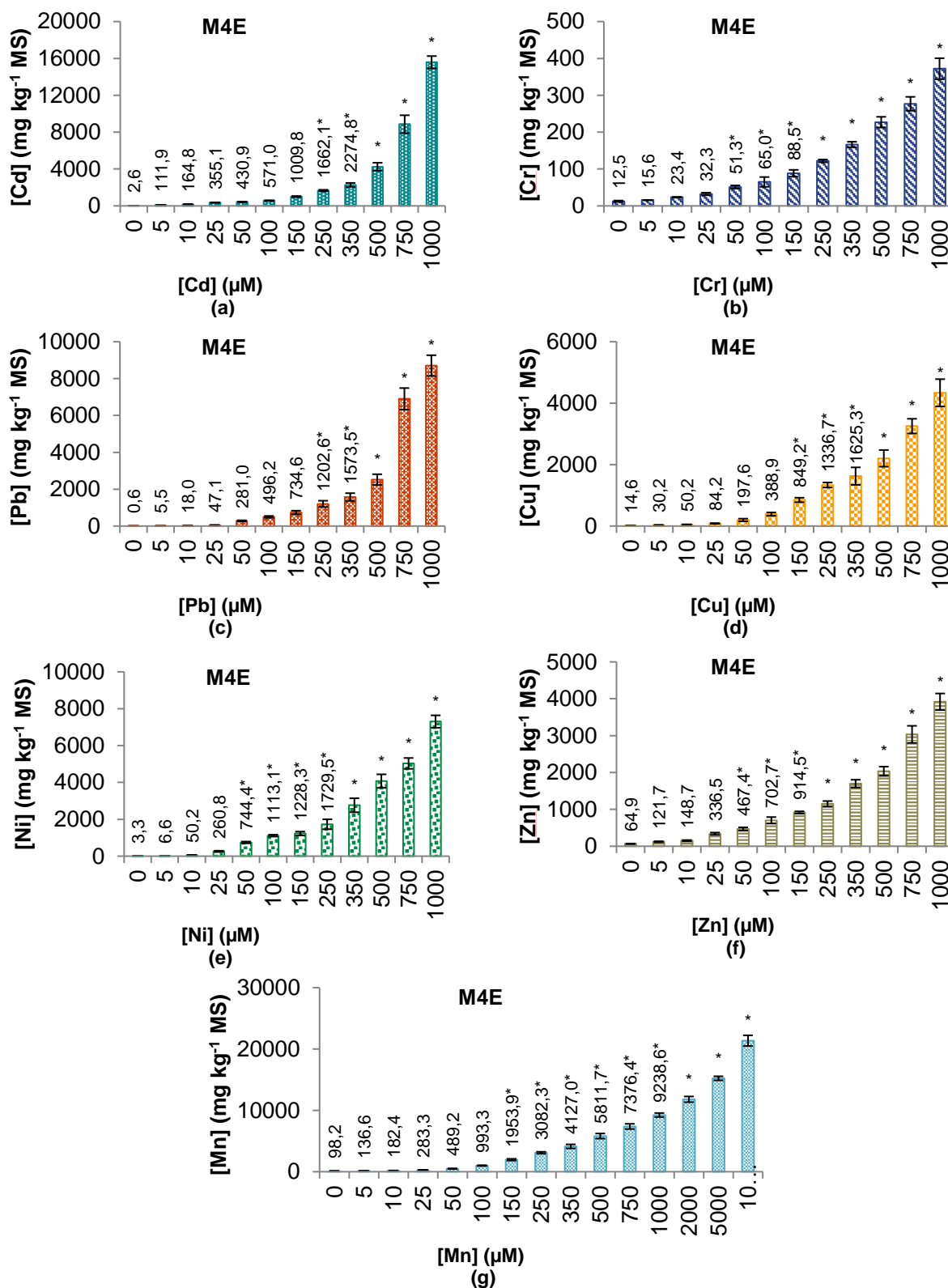
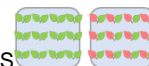
Os níveis de Cr nas plântulas permanecem muito baixos para todas as concentrações estudadas, com valores inferiores a 400  $\text{mg kg}^{-1}$  MS, até na concentração mais elevada aplicada (1000  $\mu\text{M}$ ), demonstrando que a absorção deste elemento é restrita pela plântula. No entanto, estes valores são elevados comparativamente aos referidos noutras plantas, tal como nas plântulas de aipo que cresceram durante 15 dias, na presença de 1000  $\mu\text{M}$  de Cr, que apenas acumularam 90  $\text{mg kg}^{-1}$  MS nas folhas (Scozzianti et al., 2006). Os autores referem que a quantidade de Cr aplicada foi proporcional à absorção pelas plântulas, sendo as raízes o local de maior acumulação deste elemento apesar de ocorrer alguma translocação para a parte aérea. Lopez-Luna et al. (2009) também verificaram que nas plântulas de sorgo, trigo e aveia, a acumulação de Cr também ocorreu maioritariamente nas raízes.

Existem vários estudos que referem esta tendência de acumulação de EPTs na parte aérea das plântulas que é proporcional à quantidade de elemento aplicada no meio. Os resultados obtidos por Lamhamdi et al. (2011) sugerem que um aumento na contaminação com Pb levou a uma absorção superior pelas plântulas de trigo, sendo este elemento acumulado até níveis tóxicos, tal como se verifica no presente estudo com as plântulas de alface. A absorção de Pb também aumentou de forma significativa, em plântulas de espinafre e trigo, com a crescente exposição ao contaminante, havendo diferenças significativas a partir de 1500  $\mu\text{M}$  (Lamhamdi et al., 2013). A acumulação de Cu, com o aumento da concentração aplicada também tem sido referida por vários autores (Ahsan et al., 2007b; Muccifora, 2013; Zhang et al., 2008). Ao fim de 7 dias, a aplicação de Ni também levou a uma acumulação significativa deste elemento, na parte aérea de plântulas de trigo, havendo um acréscimo significativo no teor acumulado de Ni (Gajewska et al., 2012). Resultados semelhantes também foram obtidos por outros autores, em trigo (Gajewska e Sklodowska, 2008; Gajewska et al., 2006) e em plântulas de arroz (Maheshwari e Dubey, 2009). Gajewska e Sklodowska (2010) verificaram que a aplicação de 75  $\mu\text{M}$  de Ni, Cd e Cu levou a uma acumulação significativa destes EPTs na parte aérea das plântulas de trigo. Arya e Roy (2011) referiram que a acumulação de Mn na parte aérea de plântulas de fava foi proporcional à quantidade de Mn presente no meio.



**Figura 3.24** – Concentração de Cd (a), Cr (b), Pb (c), Cu (d), Ni (e), Zn (f) ou Mn (g) na parte aérea das plântulas de alface DP, após exposição ao respectivo EPT, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=3).



**Figura 3.25** – Concentração de Cd (a), Cr (b), Pb (c), Cu (d), Ni (e), Zn (f) ou Mn (g) na parte aérea das plântulas de alface M4E, após exposição ao respectivo EPT, ao fim de 10 dias de tratamento.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos (\*) indicam a existência de diferenças significativas entre plântulas contaminadas e o controle (n=3).



A exposição da parte aérea a 0,01  $\mu\text{M}$  de Mn, aumentou em apenas 1 vez a concentração de Mn absorvido. Por outro lado, concentrações mais elevadas (40-160  $\mu\text{M}$ ), originaram um aumento de 4-8 vezes o teor de Mn presente na parte aérea, comparativamente ao controle.

### *Conclusões intercalares*

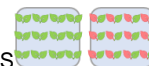
Verifica-se que há uma acumulação de quantidades significativas de todos os EPTs estudados na parte aérea das plântulas de ambas as cultivares, com o aumento da concentração de EPT. Como consequência desta acumulação os resultados obtidos mostram efeitos adversos, evidenciados não só por sintomas visíveis, como também pela massa fresca da parte aérea e raiz, e pelo comprimento da raiz.

Apesar de as concentrações aplicadas serem idênticas, a quantidade de EPT acumulada diferiu para cada elemento, verificando-se que a alface acumula uma maior quantidade de Cd e Mn. No entanto, estes resultados refletem a sensibilidade da planta à exposição a diferentes EPTS. As plântulas de alface manifestaram-se mais sensíveis à presença de Cd, provavelmente por se tratar de um elemento não essencial. Por outro, lado apesar de as elevadas quantidades acumuladas de Mn, as plântulas aparentemente demonstraram ser mais tolerantes à exposição a este elemento. A acumulação de Cu não é tão elevada, quando comparada com estes dois elementos. No entanto, verifica-se que a sua presença, mesmo acumulada em menor quantidade comparativamente a outros EPTs, afeta bastante o desenvolvimento das plântulas de alface, tal como verificado para as outras variáveis estudadas anteriormente.

### **3.5. Avaliação da toxicidade dos EPTs estudados**

Neste estudo, é realizada uma análise em componentes principais (ACP) cujo objetivo é avaliar a forma como se relacionam os parâmetros determinados, como a TG, número de plântulas viáveis, massa fresca da parte aérea e da raiz, comprimento da raiz, e a absorção do EPT.

A ACP é realizada tendo por base a matriz de correlações entre seis variáveis normalizadas: *bioshoot*, *bioroot*, *lengthroot*, *uptake*, *TG* e *plantviav*, para todos os indivíduos em estudo. A ACP é explicada num total de 80,14 % pela relação entre a componente principal 1 e a componente principal 2 (PC1 vs PC2). A PC1 é responsável por 60,66 %, enquanto a PC2 por 19,48 %. As variáveis *bioshoot* (-0,95), *bioroot* (-0,94) e *lengthroot* (-0,91) apresentam



uma correlação forte com a PC1, uma vez que os coeficientes de correlação são muito próximos em valor absoluto de 1,0 (**Tabela 3.15**). Isto não ocorre com as outras variáveis, como o *uptake* (0,77) e *plantviav* (-0,65) que apresentam uma baixa correlação com esta componente. Como se pode observar a variável *uptake* tem uma correlação negativa com as outras variáveis. A *TG* apresenta a correlação mais baixa com a PC1 (-0,14), tendo uma elevada correlação com a PC2 (-0,88).

**Tabela 3.15** – Matriz de correlações entre as variáveis e as componentes principais da ACP.

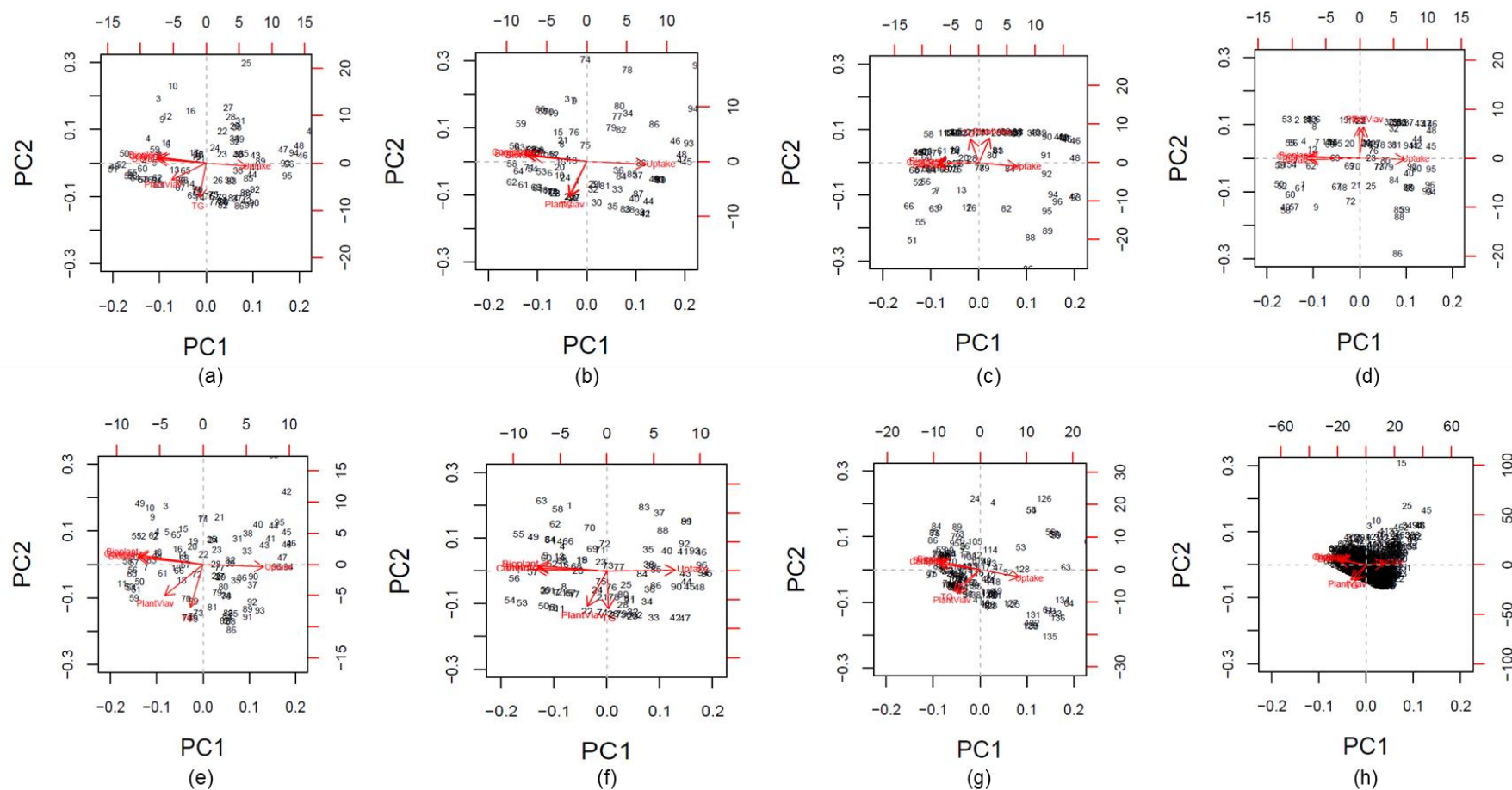
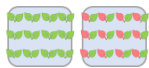
```
> round(cor(scale(Cd),prcomp(Cd, scale=T)$x),d=2)
```

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
bioshoot	-0.95	0.20	-0.18	0.00	-0.03	0.17
bioroot	-0.94	0.14	-0.24	0.02	0.19	-0.06
lengthroot	-0.91	0.19	-0.32	-0.09	-0.14	-0.10
uptake	0.77	0.00	-0.58	-0.26	0.04	0.03
TG	-0.14	-0.88	-0.44	0.14	-0.02	0.00
plantviav	-0.65	-0.55	0.46	-0.24	0.02	0.01

Os gráficos *biplot* obtidos para cada um dos EPTs em estudo encontram-se apresentados na **Figura 3.26**, nomeadamente, para o Cd (**Figura 3.26-a**), Cr (**Figura 3.26-b**), Pb (**Figura 3.26-c**), Cu (**Figura 3.26-d**), Ni (**Figura 3.26-e**), Zn (**Figura 3.26-f**), Mn (**Figura 3.26-g**) e total (**Figura 3.26-h**), e permitem obter informações sobre os indivíduos e as variáveis em estudo.

As variáveis *bioshoot*, *bioroot* e *lengthroot* apresentam vetores paralelos entre si, evidenciando uma boa correlação. Isto faz sentido pois quando a massa fresca da parte aérea aumenta, a massa fresca da raiz também apresenta a mesma tendência, ou seja, tanto a parte aérea como a raiz têm um crescimento proporcional (**Figuras 3.13-3.19**).

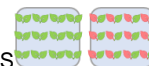
Por outro lado, um estímulo ou inibição do crescimento da raiz, que se poderá traduzir num comportamento semelhante na massa fresca da raiz, irá ter um efeito semelhante no comprimento da raiz (**Figuras 3.20-3.23**). Como é previsível, as plântulas controlo crescem mais do que plântulas submetidas ao efeito do EPT. Assim, os indivíduos, controlo e submetidos a baixas concentrações de EPT, apresentam valores de biomassa maiores e, logicamente, também o comprimento da raiz será superior. Como seria de esperar, as plântulas contaminadas apresentam uma biomassa da parte aérea e da raiz mais baixa, bem como um comprimento de raiz menor, sendo isso evidente para as concentrações mais elevadas. Isto faz sentido, uma vez que o efeito tóxico do elemento causa uma diminuição nestas três variáveis e isto é confirmado pela distribuição dos indivíduos no gráfico *biplot*.



**Figura 3.26** – Análise em componentes principais realizada para os indivíduos expostos a diferentes concentrações dos EPT: Cd (a), Cr (b), Pb (c), Cu (d), Ni (e), Zn (f), Mn (g) e total (h), considerando 6 variáveis: *bioshoot*, *bioroot*, *lengthroot*, *uptake*, *TG* e *plantviav*.

As variáveis estão representadas a **vermelho**: vetores paralelos significa que as variáveis estão bem correlacionadas; vetores com o cosseno do ângulo superior a 90° indicam uma má correlação.





A variável *uptake* tem um comportamento oposto ao observado pelas três variáveis anteriores, uma vez que o cosseno do ângulo é superior a  $90^\circ$ . Isto vem comprovar o que já foi discutido anteriormente, uma vez que plântulas mais pequenas (logo, com comprimento de raiz, biomassa da raiz e parte aérea inferiores) apresentam uma maior absorção deste elemento na plântula (**Figuras 3.24 e 3.25**).

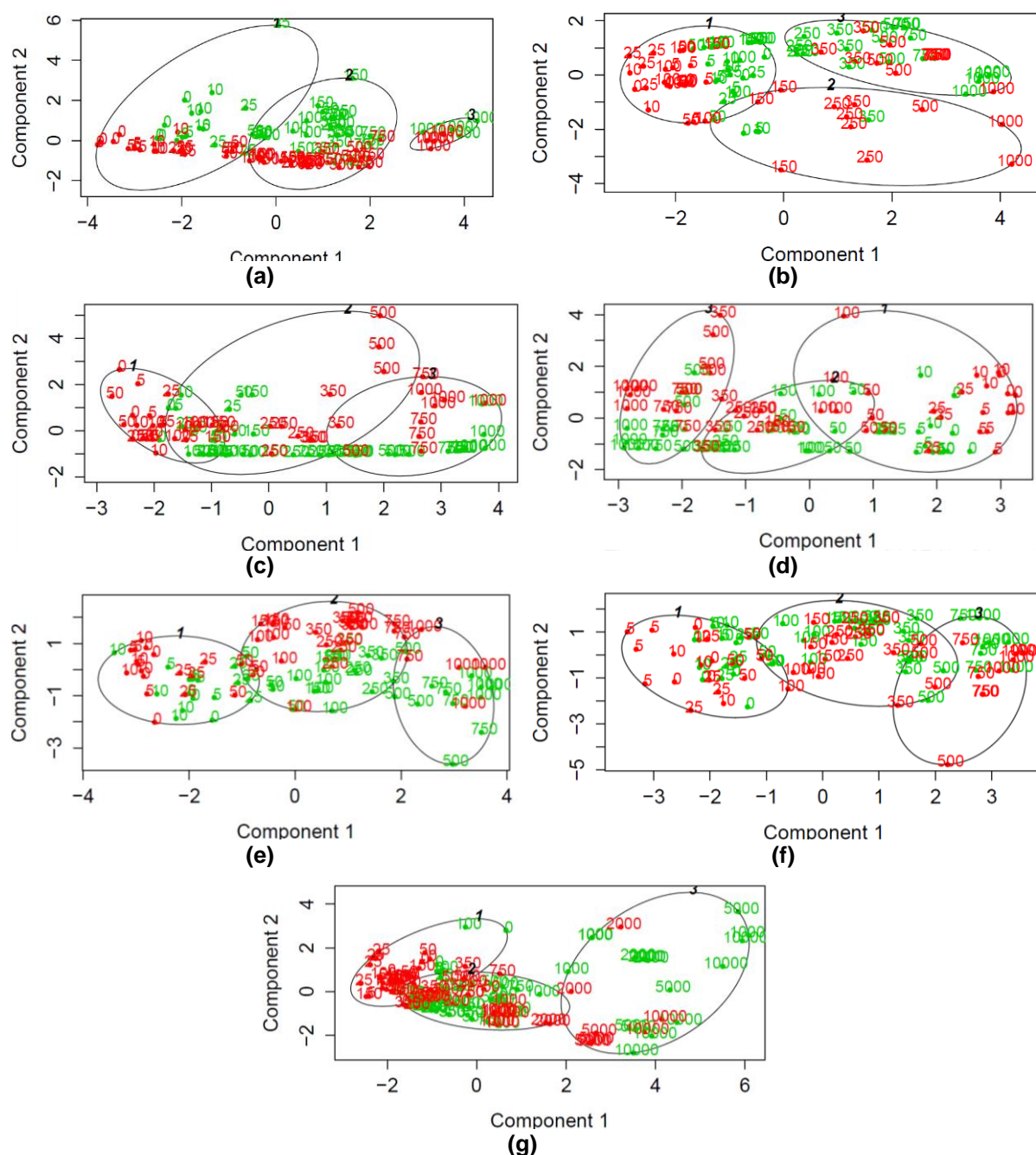
As variáveis *TG* e *plantviav* apresentam uma boa correlação entre si. Um aumento da taxa de germinação tem uma influência direta no número de plântulas viáveis porque uma plântula para ser viável tem de germinar. Contudo, a semente pode germinar e originar uma plântula não viável. Um aumento na concentração de EPT supostamente originaria uma diminuição na *TG* e no número de plântulas viáveis. No entanto, a *TG* não está correlacionada com a concentração de EPT aplicada, assim como o número de plântulas viáveis, aparentemente, também não está relacionado com a capacidade de as plântulas absorverem uma maior ou menor quantidade de EPT. Isto demonstra a tolerância das plântulas de alface em germinar em meios contaminados, com exceção das plântulas contaminadas com Cd. Neste caso, a variável *plantviav* pode ser correlacionada com a concentração de EPT aplicado, mas apenas para os indivíduos contaminados com  $1000\ \mu\text{M}$ , para ambas as cultivares.

Neste estudo, também é realizada uma análise de agrupamento em classes cujo objetivo é formar classes com base na diferenciação do efeito do PTE nas plântulas de alface. A análise classificatória permite atribuir indivíduos a grupos designados de *clusters*, de modo a que os objetos dentro do mesmo grupo sejam mais semelhantes entre si, do que os objetos que pertencem a outros grupos. Os métodos de partição (PAM) utilizam como informação inicial o número de *clusters* que se pretendem formar e a partir daí os objetos são alocados aos diferentes *clusters*, de modo a otimizar um critério de homogeneidade e/ou separação. Na **Figura 3.27** estão representados os gráficos obtidos por este método de partição para cada EPT.

Nas plântulas expostas a Cd (**Figura 3.27-a**), existe uma classe muito bem individualizada com os indivíduos sujeitos a  $1000\ \mu\text{M}$ , demonstrando que estes são diferentes de todos os outros. Nas outras duas classes são agrupados indivíduos com concentrações mais baixas, 0 a  $50\ \mu\text{M}$ , e noutra classe concentrações mais elevadas, 100 a  $500\ \mu\text{M}$ , havendo sobreposição entre classes, por existirem indivíduos que pertencem a ambas as classes.

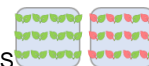
Esta tendência também ocorre para os indivíduos submetidos a Cu (**Figura 3.27-d**), onde também existe uma classe bem diferenciada constituída por indivíduos com concentrações de 500 a  $1000\ \mu\text{M}$ .





**Figura 3.27** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos expostos a diferentes concentrações de Cd (a), Cr (b), Pb (c), Cu (d), Ni (e), Zn (f) ou Mn (g), ao fim de 10 dias de tratamento. Estas duas componentes explicam 80,30 % (Cd), 83,21 % (Cr), 81,87 % (Pb), 81,27 % (Cu), 85,97 % (Ni), 82,97 % (Zn) ou 90,73 % (Mn) da variabilidade.

Os indivíduos estão apresentados com base na concentração de cada EPT aplicado. Indivíduos com coloração **verde** correspondem a plântulas de alfafa DP; indivíduos com coloração **vermelha** correspondem a plântulas de alfafa M4E.



Nas outras duas classes encontram-se indivíduos com concentrações intermédias de contaminante (150-350  $\mu\text{M}$ ) e indivíduos com concentrações mais baixas e controlo (0-100  $\mu\text{M}$ ).

É interessante verificar que as plântulas de alface foram mais sensíveis ao Cd e Cu e foram estes que apresentaram classes bem individualizadas nestes métodos de partição, evidenciando um efeito significativo destes elementos.

Em mais nenhum EPT existe esta clara individualização de uma classe com concentrações mais elevadas. O Cr (**Figura 3.27-b**), Pb (**Figura 3.27-c**), Ni (**Figura 3.27-e**), Zn (**Figura 3.27-f**) e Mn (**Figura 3.27-g**) apresentam a mesma tendência, ou seja, uma classe com indivíduos controlo e concentrações mais baixas, outra classe com indivíduos submetidos a concentrações intermédias e uma classe com indivíduos expostas a concentrações mais elevadas, mas sem existir uma classe distinta com indivíduos mais contaminados, havendo em todos uma sobreposição de classes. No caso do Mn, é possível observar que existe uma classe relativamente “bem individualizada” onde se encontram maioritariamente os indivíduos sujeitos às concentrações mais elevadas, estando os restantes em duas classes sobrepostas, isto confirma a tolerância das plântulas de alface para este elemento.

#### *Conclusões intercalares*

As variáveis *bioshoot*, *bioroot* e *lengthroot* estão bem correlacionadas entre si, ao contrário da variável *uptake* que apresenta um comportamento contrário. Quando as variáveis massa fresca, da parte aérea e da raiz, e comprimento da raiz diminuem, o valor de *uptake* aumenta.

As variáveis *TG* e *plantviav* estão bem correlacionadas entre si. A *TG* não está correlacionada com a concentração do metal aplicado, mas sim com a própria capacidade germinativa da semente. A semente germina tanto num meio muito ou pouco contaminado. A variável *plantviav* aparentemente também não está correlacionada com a capacidade da plântula em absorver uma maior ou menor quantidade de EPT, evidenciando a tolerância das plântulas de alface em resistir a meios contaminados, com exceção das plântulas contaminadas com Cd, em que o número de plântulas viáveis poderá estar correlacionado com a concentração do elemento aplicado.

Através da análise de *clustering*, é interessante verificar a confirmação da separação numa classe diferenciada com as plântulas de alface mais contaminadas com Cd e Cu, o que está de acordo com os resultados obtidos anteriormente relativamente à sensibilidade das



plântulas de alface à presença destes EPTs. Estes indivíduos são mais semelhantes entre si, o que evidencia um efeito significativo destes elementos nas plântulas de alface. Nos outros EPTs, apesar de haver uma separação em 3 classes, ocorre sobreposição de classes não havendo uma clara separação.

No entanto, através desta classificação não é possível verificar as diferenças existentes entre as duas cultivares ao nível de sensibilidade para os restantes EPTs descritas anteriormente para outras variáveis.

### 3.6. Conclusões

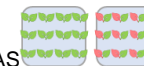
Na **Tabela 3.16**, encontra-se resumido o efeito da toxicidade dos EPTs na germinação e, no posterior, crescimento das duas cultivares de alface.

As sementes de alface germinam em todas as concentrações testadas de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn e Mn (entre 5 e 1000  $\mu\text{M}$ , à exceção do Mn que variou entre 5 e 10000  $\mu\text{M}$ ). O tegumento da semente de alface constituiu uma barreira à entrada de diferentes EPTs até ao contacto direto com o embrião, para ambas as cultivares de alface, evitando assim efeitos de toxicidade no processo germinativo. Por este motivo, a TG não é influenciada pela presença de EPTs.

As sementes de alface, das duas cultivares, manifestam-se bastante tolerantes à presença destes elementos durante o processo germinativo.

A contagem do número de plântulas viáveis, nos primeiros dias de desenvolvimento, também evidencia uma certa tolerância das plântulas de alface em crescer em meios contaminados, com exceção para a exposição com Cd (1000  $\mu\text{M}$ ). Por isso, regra geral, as plântulas viáveis também não são influenciadas pelo efeito tóxico destes elementos, à exceção do Cd, sugerindo que as plântulas de alface são sensíveis à presença de concentrações elevadas deste elemento.

O posterior crescimento e desenvolvimento das plântulas de alface apresenta uma maior sensibilidade à presença de EPTs, que o processo germinativo, sendo observada uma diminuição da biomassa da raiz e parte aérea, comprimento da raiz, índice de vigor das plântulas e tolerância da raiz, com o aumento da concentração de EPT, assim como o aparecimento de sintomas visíveis de toxicidade.

**Tabela 3.16** – Resumo do efeito de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni, Zn e Mn nos ensaios de germinação e desenvolvimento de plântulas.

Variável	Cultivar	Cd	Cr	Pb	Cu	Ni	Zn	Mn
Massa fresca da parte aérea	DP	≥ 25 µM	≥ 250 µM	≥ 250 µM	≥ 50 µM	≥ 50 µM	≥ 50 µM	≥ 500 µM
		Cd > Cu ≅ Ni ≅ Zn > Pb ≅ Cr > Mn						
	M4E	≥ 5 µM	≥ 50 µM	≥ 150 µM	≥ 25 µM	≥ 50 µM	≥ 50 µM	≥ 500 µM
		Cd > Cu > Ni ≅ Zn > Pb > Cr > Mn						
Massa fresca da raiz	DP	≥ 50 µM	≥ 1000 µM	≥ 150 µM	≥ 5 µM	≥ 25 µM	≥ 150 µM	≥ 350 µM
		Cu > Ni ⊕ > Cd > Pb ≅ Zn > Mn > Cr ⊕						
	M4E	≥ 50 µM	≥ 250 µM	≥ 250 µM	≥ 50 µM	≥ 50 µM	≥ 350 µM	≥ 500 µM
		Cu ≅ Cd ≅ Ni > Cr ≅ Pb > Zn ⊕ > Mn ⊕						
Comprimento da raiz	DP	≥ 5 µM	≥ 150 µM	≥ 50 µM	≥ 25 µM	≥ 25 µM	≥ 50 µM	≥ 750 µM
	M4E	≥ 5 µM	≥ 150 µM	≥ 50 µM	≥ 25 µM	≥ 25 µM	≥ 50 µM	≥ 750 µM
		Cd > Cu ≅ Ni > Pb ≅ Zn > Cr > Mn						
TG	DP	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
	M4E	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
		Cd ≅ Cu ≅ Pb ≅ Ni ≅ Zn ≅ Cr ≅ Mn						
Número de plântulas viáveis	DP	1000 µM	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
	M4E	1000 µM	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
		Cd > Cu ≅ Pb ≅ Ni ≅ Zn ≅ Cr ≅ Mn						
IVP	DP	7,1	156,3	40,4	11,6	68,7	145,8	658,9
	M4E	19,1	97,3	67,2	31,7	48,4	136,2	789,6
		Cd > Cu > Pb > Ni > Zn > Cr > Mn						
ITR	DP	0,8	18,9	4,7	1,3	8,5	15,7	77,6
	M4E	2,1	11,8	8,0	3,5	5,9	14,7	88,4
		Cd < Cu < Pb < Ni < Zn < Cr < Mn						

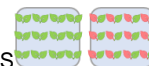
A cinza encontra-se uma ordem crescente de toxicidade por EPT. A concentração de EPT representada corresponde à concentração que tem a capacidade de diminuir significativamente dada variável. Para o IVP e ITR, os valores são referentes a 1000 µM. s/d indica sem diferenças significativas. O símbolo ⊕ indica que houve estímulo do crescimento de dada variável.



A toxicidade provocada pela presença destes elementos levou ao aparecimento de sintomas visíveis nas plântulas (diminuição do tamanho das folhas, escurecimento da raiz, cloroses e necroses), diminuição do crescimento das plântulas, da biomassa da parte aérea e raiz, comprimento da raiz, vigor das plântulas e índices de tolerância e aumento dos índices de inibição. A presença de EPTs afeta principalmente a viabilidade da raiz, impedindo as plântulas de absorver os nutrientes, o que levou à inibição do seu crescimento posterior, principalmente quando a concentração aplicada ultrapassou a capacidade de resposta de defesa da plântula.

A capacidade de tolerância das plântulas de alface face à toxicidade crescente de cada elemento difere conforme o tipo de EPT, estimulando e/ou inibindo o crescimento das plântulas de alface. O Cd (MF-parte aérea:  $\geq 25 \mu\text{M}$  (DP),  $\geq 5 \mu\text{M}$  (M4E); MF-raiz:  $\geq 50 \mu\text{M}$  (DP, M4E); comprimento da raiz:  $\geq 5 \mu\text{M}$  (DP, M4E)) e Cu (MF-parte aérea:  $\geq 50 \mu\text{M}$  (DP),  $\geq 25 \mu\text{M}$  (M4E); MF-raiz:  $\geq 5 \mu\text{M}$  (DP);  $\geq 50 \mu\text{M}$  (M4E); comprimento da raiz:  $\geq 25 \mu\text{M}$  (DP, M4E)) são os EPTs que induzem efeitos tóxicos mais acentuados nas plântulas de alface, enquanto o Mn (MF-parte aérea:  $\geq 500 \mu\text{M}$  (DP, M4E); MF-raiz:  $\geq 350 \mu\text{M}$  (DP),  $\geq 500 \mu\text{M}$  (M4E); comprimento da raiz:  $\geq 750 \mu\text{M}$  (DP, M4E)) é o elemento com menor toxicidade. No entanto, existem diferenças entre o comportamento das duas cultivares. Regra geral, verifica-se que baixas concentrações de Mn, Ni e Cr estimulam o crescimento das plântulas de alface DP, sendo esta mais sensível à presença de Cu. Por outro lado, baixas concentrações de Zn e Mn promovem o crescimento da alface M4E, sendo esta menos tolerante à presença de Cd. Em suma, o efeito da presença de elementos não essenciais pode ser classificado como: Cd > Pb > Cr, e para os elementos essenciais como: Cu > Ni > Zn > Mn.

Através deste estudo é possível verificar que as plântulas de alface conseguem sobreviver em meios contaminados com diversas concentrações de EPTs, demonstrando que, regra geral, o Cd e Cu são mais tóxicos para as plântulas e o Mn apresenta menor toxicidade, sendo este comportamento confirmado através da análise dos resultados obtidos para todas as variáveis em estudo, os métodos de partição realizados para cada EPT e pela ordem crescente de toxidade que é apresentada na **Tabela 3.16**.



### 3.7. Referências Bibliográficas

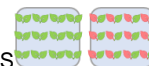
- Abdul-Baki, A., Anderson, D. (1973). Relationship between decarboxylation of glutamic acid and vigor in soybean seed. *Crop Science*, **13**, 227-232.
- Ahmad, I., Akhtar, M. J., Asghar, H. N., Zahir, Z. A. (2013). Comparative Efficacy of Growth Media in Causing Cadmium Toxicity to Wheat at Seed Germination Stage. *International Journal of Agriculture and Biology* **15**, 517-522.
- Ahmad, M. S., Ashraf, M. (2011). Essential roles and hazardous effects of nickel in plants. *Rev Environ Contam Toxicol* **214**, 125-67.
- Ahsan, N., Lee, D. G., Lee, S. H., Kang, K. Y., Lee, J. J., Kim, P. J., Yoon, H. S., Kim, J. S., Lee, B. H. (2007b). Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* **67**, 1182-1193.
- Ahsan, N., Lee, S.-H., Lee, D.-G., Lee, H., Lee, S. W., Bahk, J. D., Lee, B.-H. (2007a). Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. *Comptes Rendus Biologies* **330**, 735-746.
- Akinci, I. E., Akinci, S. (2010). Effect of chromium toxicity on germination and early seedling growth in melon (*Cucumis melo* L.). *African Journal of Biotechnology* **9**, 4589-4594.
- Akinci, I. E., Akinci, S., Yilmaz, K. (2010). Response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead toxicity: growth, element uptake, chlorophyll and water content. *Afr. J. Agric. Res.* **5**.
- Alam, M. M., Hayat, S., Ali, B., Ahmad, A. (2007). Effect of 28-homobrassinolide treatment on nickel toxicity in *Brassica juncea*. *Photosynthetica* **45**, 139-142.
- Almeida, D. (2006). "Manual de Culturas Hortícolas – Volume I," Editorial Presença, Lisboa.
- An, Y. (2004). Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environmental Pollution* **127**, 21-26.
- An, Y. J., Kim, Y. M., Kwon, T. I., Jeong, S. W. (2004). Combined effect of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. *Science of the Total Environment* **326**, 85-93.
- Andaleeb, F., Zia, M., Ashraf, M., Khalid, Z. (2008). Effect of chromium on growth attributes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Environmental Sciences* **20**, 1475-1480.
- Arya, S. K., Roy, B. K. (2011). Manganese induced changes in growth, chlorophyll content and antioxidants activity in seedlings of broad bean (*Vicia faba* L.). *Journal of Environmental Biology* **32**, 707-711.
- Ashraf, M. Y., Sadiq, R., Hussain, M., Ashraf, M., Ahmad, M. S. (2011). Toxic effect of nickel (Ni) on growth and metabolism in germinating seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biol Trace Elem Res* **143**, 1695-703.
- Aydin, S. S., Gokce, E., Buyuk, I., Aras, S. (2012). Characterization of stress induced by copper and zinc on cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by means of molecular and population parameters. *Mutat Res* **746**, 49-55.
- Bae, J., Benoit, D. L., Watson, A. K. (2016). Effect of heavy metals on seed germination and seedling growth of common ragweed and roadside ground cover legumes. *Environmental Pollution* **213**.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 806-814.





- Bautista, O. V., Fischer, G., Cárdenas, J. F. (2013). Cadmium and chromium effects on seed germination and root elongation in lettuce, spinach and Swiss chard. *Agronomía Colombiana* **31**, 48-57.
- Bewley, J. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* **9**, 1055-1066.
- Beyer, W. N., Green, C. E., Beyer, M., Chaney, R. L. (2013). Phytotoxicity of zinc and manganese to seedlings grown in soil contaminated by zinc smelting. *Environmental Pollution* **179**, 167-176.
- Bityutskii, N. P. M., S. V.; Korobeynikova, L. P.; Lukina, E. I.; Soloviova, A. N.; Patsevitch, V. G.; Lapshina, I. N.; Matveeva, G. V. (2002). Distribution of iron, manganese, and zinc in Mature grain and their mobilization during Germination and early seedling development in Maize. *Journal of Plant Nutrition* **25**, 635-653.
- Boominathan, R., Doran, P. M. (2002). Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New Phytologist* **156**, 205-215.
- Carlson, C. L., Adriano, D. C., Sajwan, K. S., Abels, S. L., Thoma, D. P., Driver, J. T. (1991). Effects of selected trace metals on germinating seeds of six plant species. *Water, Air, and Soil Pollution* **59**, 231-240.
- Di Salvatore, M., Carafa, A. M., Carratù, G. (2008). Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere* **73**, 1461-1464.
- Farouk, S., Mosa, A. A., Taha, A. A., Ibrahim, H. M., EL-Gahmery, A. M. (2011). Protective Effect of Humic acid and Chitosan on Radish (*Raphanus sativus*, L. var. *sativus*) Plants Subjected to Cadmium Stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* **7**, 100-116.
- Finger-Teixeira, A., Lucio Ferrarese, M. d. L., Ricardo Soares, A., da Silva, D., Ferrarese-Filho, O. (2010). Cadmium-induced lignification restricts soybean root growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**, 1959-1964.
- Gajewska, E., Bernat, P., Długoński, J., Skłodowska, M. (2012). Effect of Nickel on Membrane Integrity, Lipid Peroxidation and Fatty Acid Composition in Wheat Seedlings. *Journal of Agronomy and Crop Science* **198**, 286-294.
- Gajewska, E., Skłodowska, M. (2008). Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: antioxidative reactions and proline accumulation. *Plant Growth Regulation* **54**, 179-188.
- Gajewska, E., Skłodowska, M. (2010). Differential effect of equal copper, cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf* **73**, 996-1003.
- Gajewska, E., Skłodowska, M., Slaba, M., Mazur, J. (2006). Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum* **50**, 653-659.
- Gapper, C., Dolan, L. (2006). Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol.* **141**, 341-345.
- Gonçalves, J. F., Becker, A. G., Cargnelutti, D., Tabaldi, L. A., Pereira, L. B., Battisti, V., Spanevello, R. M., Morsch, V. M., Nicoloso, F. T., Schetinger, M. R. C. (2007). Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **19**, 223-232.
- Hegarty, T. W. (1978). The physiology of seed hydration and dehydration, and the relation between water stress and the control of germination: a review. *Plant, Cell & Environment* **1**, 101-119.

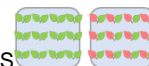




- Jiang, W., Liu, D., Li, H. (2000). Effects of Cu<sup>2+</sup> on root growth, cell division, and nucleolus of *Helianthus annuus* L. *Science of The Total Environment* **256**, 59-65.
- Kabir, M., Iqbal, Z. M., Shafiq, M., Farooqi, Z. R. (2008). Reduction in germination and seedling growth of *Thespesia populnea* L., caused by lead and cadmium treatments. . *Pak. J. Bot.* **40**, 2419-2426.
- Karmous, I., El Ferjani, E., Chaoui, A. (2011). Copper Excess Impairs Mobilization of Storage Proteins in Bean Cotyledons. *Biological Trace Element Research* **144**, 1251-1259.
- Kiran, Y. S., A. (2005). The effects of the lead on the seed germination, root growth, and root tip cell mitotic divisions of *lens culinaris medik.* *G.U. J. Sci.* **18**, 17-25.
- Kjær, C., Pedersen, M. B., Elmegaard, N. (1998). Effects of Soil Copper on Black Bindweed (*Fallopia convolvulus*) in the Laboratory and in the Field. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **35**.
- Kopyra, M., Gwozdz, E. A. (2003). Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 1011-1017.
- Kranner, I., Colville, L. (2011). Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environmental and Experimental Botany* **72**, 93-105.
- Lamhamdi, M., Bakrim, A., Aarab, A., Lafont, R., Sayah, F. (2011). Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth. *C R Biol* **334**, 118-26.
- Lamhamdi, M., El Galiou, O., Bakrim, A., Nóvoa-Muñoz, J. C., Arias-Estévez, M., Aarab, A., Lafont, R. (2013). Effect of lead stress on mineral content and growth of wheat (*Triticum aestivum*) and spinach (*Spinacia oleracea*) seedlings. *Saudi Journal of Biological Sciences* **20**, 29-36.
- Lefèvre, I., Marchal, G., Corréal, E., Zanuzzi, A., Lutts, S. (2009). Variation in response to heavy metals during vegetative growth in *Dorycnium pentaphyllum* Scop. *Plant Growth Regulation* **59**, 1-11.
- Li, W., Khan, M. A., Yamaguchi, S., Kamiya, Y. (2005). Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* **46**, 45-50.
- Liu, S., Yang, C., Xie, W., Xia, C., Fan, P. (2012). The Effects of Cadmium on Germination and Seedling Growth of *Suaeda salsa*. *Procedia Environmental Sciences* **16**, 293-298.
- Liu, X., Zhang, S., Shan, X.-q., Christie, P. (2007). Combined toxicity of cadmium and arsenate to wheat seedlings and plant uptake and antioxidative enzyme responses to cadmium and arsenate co-contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **68**, 305-313.
- Lopez-Luna, J., Gonzalez-Chavez, M. C., Esparza-Garcia, F. J., Rodriguez-Vazquez, R. (2009). Toxicity assessment of soil amended with tannery sludge, trivalent chromium and hexavalent chromium, using wheat, oat and sorghum plants. *J Hazard Mater* **163**, 829-34.
- Maheshwari, R., Dubey, R. S. (2009). Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. *Plant Growth Regulation* **59**, 37-49.
- Mahmood, S., Hussain, A., Saeed, Z., Athar, M. (2005). Germination and seedling growth of corn (*Zea mays* L.) under varying levels of copper and zinc. *International Journal of Environmental Science & Technology* **2**, 269-274.
- Mahmood, T., Islam, K., Muhammad, S. (2007). Toxic effects of heavy metals on early growth and tolerance of cereal crops. . *Pak. J. Bot.* **39**, 451-462.



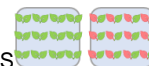
- Marichali, A., Dallali, S., Ouerghemmi, S., Sebei, H., Hosni, K. (2014). Germination, morpho-physiological and biochemical responses of coriander (*Coriandrum sativum* L.) to zinc excess. *Industrial Crops and Products* **55**, 248-257.
- Marquez-Garcia, B., Marquez, C., Sanjose, I., Nieva, F. J., Rodriguez-Rubio, P., Munoz-Rodriguez, A. F. (2013). The effects of heavy metals on germination and seedling characteristics in two halophyte species in Mediterranean marshes. *Mar Pollut Bull* **70**, 119-24.
- Martínez-Fernández, D., Walker, D. J., Romero-Espinar, P., Flores, P., del Río, J. A. (2011). Physiological responses of *Bituminaria bituminosa* to heavy metals. *Journal of Plant Physiology* **168**, 2206-2211.
- Michael, P. I., Krishnaswamy, M. (2011). The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **74**, 171-177.
- Mihoub, A., Chaoui, A., El Ferjani, E. (2005). Biochemical changes associated with cadmium and copper stress in germinating pea seeds *Comptes Rendus Biologies* **328**, 33-41.
- Moïse, J. A., Han, S., Gudynaite-Savitch, L., Johnson, D. A., Miki, B. L. A. (2005). Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **41**, 620-644.
- Moosavi, S. A., Gharineh, M. H., Tavakkol Afshari, R., Ebrahimi, A. (2012). Effects of Some Heavy Metals on Seed Germination Characteristics of Canola (*Barassica napus*), Wheat (*Triticum aestivum*) and Safflower (*Carthamus tinctorious*) to Evaluate Phytoremediation Potential of These Crops. *2012* **4**.
- Moroni, J. S., Briggs, K. G., Blenis, P. V., Taylor, G. J. (2013). Generation mean analysis of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings tolerant to high levels of manganese. *Euphytica* **189**, 89-100.
- Mourato, M., Reis, R., Martins, L. (2012). Characterization of Plant Antioxidative System in Response to Abiotic Stresses: A Focus on Heavy Metal Toxicity. In "Advances in Selected Plant Physiology Aspects" (G. Montanaro and B. Dichio, eds.), pp. 23-44. Intech, Rijeka.
- Muccifora, S. B., L. M. (2013). Effects of copper on germination and reserve mobilization in *Vicia sativa* L. seeds. *Environmental Pollution* **179**, 68-74.
- Mumthas, S., Chidambaram, A., Sundaramoorthy, P., Ganesh, K. (2010). Effect of arsenic and manganese on root growth and cell division in root tip cells of green gram (*Vigna radiata* L.). *Emir. J. Food Agric.* **22**, 285-297.
- Munzuroglu, O. G., H. (2002). Effects of Metals on Seed Germination, Root Elongation, and Coleoptile and Hypocotyl Growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. . *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **43**, 203-213.
- Nagajyoti, P., Lee, K., Sreekanth, T. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* **8**, 199-216.
- Nonogaki, M., Nonogaki, H. (2017). Germination. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)* **1**, 509-512.
- Nonogakia, H., Basselb, G. W., Bewley, J. D. (2010). Germination—Still a mystery. *Plant Science* **179** 574-581.
- Novo, L., González, L. (2014). Germination and Early Growth of *Brassica juncea* in Copper Mine Tailings Amended with Technosol and Compost. *The Scientific World Journal*, 1-9.



- Ozdener, Y., Kutbay, H. G. (2009). Toxicity of copper, cadmium, nickel, lead and zinc on seed germination and seedling growth in *Eruca sativa*. *Fresenius Environmental Bulletin* **18**, 26-31.
- Pandey, N., Sharma, C. P. (2002). Effect of heavy metals  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science* **163**, 753-758.
- Peralta, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E., Parsons, J. G. (2001). Uptake and Effects of Five Heavy Metals on Seed Germination and Plant Growth in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **66**, 727-734.
- Pokhrel, L. R., Dubey, B. (2013). Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Science of The Total Environment* **452-453**, 321-332.
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., Pinelli, E. (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Rev Environ Contam Toxicol* **213**, 113-36.
- Prom-u-thai, C., Rerkasem, B., Yazici, A., Cakmak, I. (2012). Zinc priming promotes seed germination and seedling vigor of rice. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **175**, 482-488.
- Rady, M. M. (2011). Effect of 24-epibrassinolide on growth, yield, antioxidant system and cadmium content of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants under salinity and cadmium stress. *Scientia Horticulturae* **129** **129**, 232-237.
- Rahoui, S., Chaoui, A., Ferjani, E. E. (2010). Membrane damage and solute leakage from germinating pea seed under cadmium stress. *Journal of Hazardous Materials* **178**, 1128-1131.
- Reichman, S. M. (2002). "The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc."
- Rossato, L., MacFarlane, J., Whittaker, M., Pudmenzky, A., Doley, D., Schmidt, S., Monteiro, M. J. (2011). Metal-binding particles alleviate lead and zinc toxicity during seed germination of metallophyte grass *Astrebola lappacea*. *Journal of Hazardous Materials* **190** 772-779.
- Samantary, S. (2002). Biochemical responses of Cr-tolerant and Cr-sensitive mung bean cultivars grown on varying levels of chromium. *Chemosphere* **47**, 1065-72.
- Sandoval, J. A., Huang, Z.-H., Garrett, D. C., Gage, D. A., Chapman, K. D. (1995). N-Acylphosphatidylethanolamine in dry and imbibing cotton seeds. Amounts, molecular species, and enzymatic synthesis. *Plant Physiol.* **109**, 269-275.
- Santos, C., Rodriguez, E. (2012). Review on Some Emerging Endpoints of Chromium (VI) and Lead Phytotoxicity. In "Botany" (J. Mworio, ed.), pp. 61-82. InTech.
- Scoccianti, V., Crinelli, R., Tirillini, B., Mancinelli, V., Speranza, A. (2006). Uptake and toxicity of Cr(III) in celery seedlings. *Chemosphere* **64**, 1695-1703.
- Seregin, I. V., Kozhevnikova, A. D. (2005). Distribution of Cadmium, Lead, Nickel, and Strontium in Imbibing Maize Caryopses. *Russian Journal of Plant Physiology* **52**, 565-569.
- Sethy, S. K., Ghosh, S. (2013 ). Effect of heavy metals on germination of seeds. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* **4**, 272-275.
- Sfaxi-Bousbih, A., Chaoui, A., El Ferjani, E. (2010a). Copper affects the cotyledonary carbohydrate status during the germination of bean seed. *Biol Trace Elem Res* **137**, 110-6.



- Sfaxi-Bousbih, A., Chaoui, A., El Ferjani, E. (2010b). Unsuitable Availability of Nutrients in Germinating Bean Embryos Exposed to Copper Excess. *Biological Trace Element Research* **135**, 295-303.
- Shafiq, M., Zafar, I. M., Athar, M. (2008). Effect of lead and cadmium on germination and seedling growth of *Leucaena leucocephala*. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* **12**, 61–66.
- Shaikh, I. R., Shaikh, P. R., Shaikh, R. A., Shaikh, A. A. (2013). Phytotoxic effects of Heavy metals (Cr, Cd, Mn and Zn) on Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seed Germination and Seedlings growth in Black Cotton Soil of Nanded, India. *Research Journal of Chemical Sciences* **3**, 14-23.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International* **31**, 739-753.
- Sharma, P., Dubey, R. S. (2005). Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* **17**, 35-52.
- Shekar, C. C., Sammaiah, D., Rambabu, M., Reddy, K. J. (2011). Effect of cadmium on tomato growth and yield attributes. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* **1**, 109-112.
- Siddiqui, M. M., Abbasi, B. H., Ahmad, N., Ali, M., Mahmood, T. (2014). Toxic effects of heavy metals (Cd, Cr and Pb) on seed germination and growth and DPPH-scavenging activity in *Brassica rapa* var. turnip. *Toxicology and Industrial Health* **30**, 238–249.
- Siddiqui, S., Meghvansi, M. K., Wani, M. A., Jabee, F. (2009). Evaluating cadmium toxicity in the root meristem of *Pisum sativum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* **31**, 531.
- Singh, D., Nath, K., Sharma, Y. K. (2007). Response of wheat seed germination and seedling growth under copper stress. *J Environ Biol* **28**, 409-14.
- Singh, H. P., Kaur, G., Batish, D. R., Kohli, R. K. (2011). Lead (Pb)-inhibited radicle emergence in *Brassica campestris* involves alterations in starch-metabolizing enzymes. *Biol Trace Elem Res* **144**, 1295-301.
- Singh, K. (2001). Effect of trivalent and hexavalent chromium on spinach (*Spinacea oleracea* L.). *Environ Ecol.* **19**, 807-10.
- Srivastava, R. K., Pandey, P., Rajpoot, R., Rani, A., Dubey, R. S. (2014). Cadmium and lead interactive effects on oxidative stress and antioxidative responses in rice seedlings. *Protoplasma* **251**, 1047-65.
- Street, R. A., Kulkarni, M. G., Stirk, W. A., Southway, C., Van Staden, J. (2007). Toxicity of Metal Elements on Germination and Seedling Growth of Widely Used Medicinal Plants Belonging to Hyacinthaceae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **79**, 371-376.
- Vijayaragavan, M., Prabhakar, C., Sureshkumar, J., Natarajan, A., Vijayarengan, P., Sharavanan, S. (2011). Toxic effect of cadmium on seed germination, growth and biochemical contents of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) plants. *International Multidisciplinary Research Journal* **1**, 1-6.
- Visioli, G., Conti, F. D., Gardi, C., Menta, C. (2014). Germination and root elongation bioassays in six different plant species for testing Ni contamination in soil. *Bull Environ Contam Toxicol* **92**, 490-6.
- Wierzbicka, M., Obidzińska, J. (1998). The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. *Plant Science* **137**, 155-171.
- Yadav, S. S., Shukla, R., Sharma, Y. K. (2009). Nickel toxicity on seed germination and growth in radish (*Raphanus sativus*) and its recovery using copper and boron. *Journal of Environmental Biology* **30**, 461-466.
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* **17**, 145-156.



- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Hayat, S., Ahmad, A. (2011). Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **86**, 1-17.
- Zeid, I. M. (2001). Responses of Phaseolus Vulgaris Chromium and Cobalt Treatments. *Biologia Plantarum* **44**, 111-115.
- Zhang, H., Hu, L. Y., Hu, K. D., He, Y. D., Wang, S. H., Luo, J. P. (2008). Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *J Integr Plant Biol* **50**, 1518-29.
- Zhi, Y., Deng, Z. H., Luo, M. D., Ding, W., Hu, Y. Q., Deng, J. F., Li, Y. Y., Zhao, Y. P., Zhang, X. K., Wu, W. H., Huang, B. Q. (2015). Influence of Heavy Metals on Seed Germination and Early Seedling Growth in Eruca sativa Mill. *American Journal of Plant Sciences* **6**, 582-590.







# Capítulo IV

## Avaliação da acumulação de EPTs







## Índice

Índice .....	151
Índice de Figuras.....	153
Índice de Tabelas .....	157
Resumo.....	159
Capítulo IV - AVALIAÇÃO DA ACUMULAÇÃO DE EPTs .....	160
4.1. Objetivo .....	160
4.2. Introdução.....	160
4.2.1. Absorção de elementos minerais pela planta .....	161
4.2.2. Acumulação de metais pesados pelas plantas .....	166
4.2.3.1. Cádmio .....	171
4.2.3.2. Crômio .....	173
4.2.3.3. Chumbo .....	174
4.2.3.4. Cobre .....	176
4.2.3.5. Níquel .....	177
4.2.3.6. Zinco .....	178
4.3. Material e métodos .....	179
4.3.1. Material Vegetal .....	179
4.3.2. Delineamento experimental .....	179
4.3.3. Instalação dos ensaios .....	182
4.3.4. Colheita, amostragem e conservação de amostras .....	183
4.3.5. Determinações analíticas .....	184
4.3.5.1. Determinação da concentração de elementos químicos .....	184
4.3.5.2. Acumulação de EPT .....	184
4.3.5.3. Índices para avaliação da toxicidade dos EPTs estudados .....	185
4.3.6. Tratamento estatístico .....	186
4.4. Resultados e Discussão.....	187
4.4.1. Cádmio.....	187
4.4.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Cd .....	187
4.4.1.2. Caracterização da acumulação de Cd .....	193
4.4.2. Crômio.....	200
4.4.2.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Cr .....	200
4.4.2.2. Caracterização da acumulação de Cr .....	205



4.4.3. Chumbo.....	211
4.4.3.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Pb .....	211
4.4.3.2. Caracterização da acumulação de Pb.....	216
4.4.4. Cobre .....	224
4.4.4.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade de induzidos pelo Cu .....	224
4.4.4.2. Caracterização da acumulação de Cu .....	229
4.4.5. Níquel.....	234
4.4.5.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Ni .....	234
4.4.5.2. Caracterização da acumulação de Ni.....	241
4.4.6. Zinco .....	247
4.4.6.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Zn.....	247
4.4.6.2. Caracterização da acumulação de Zn.....	252
4.5. Avaliação da toxicidade dos EPTs estudados.....	259
4.6. Conclusões .....	268
4.7 Referências Bibliográficas.....	273



## Índice de Figuras

<b>Figura 4.1</b> – Esquema representativo dos mecanismos envolvidos na absorção e transporte de elementos na planta. Em (a), após a absorção, os elementos são transportados pelo xilema na sua forma livre ou em formas conjugadas. Através do fluxo da água, os iões são transportados até à parte aérea, saindo do xilema (b). Nas células da parte aérea, os iões são distribuídos pelas células (c). Uma pequena fração pode ser novamente transferida, através do floema, até ao tecido radicular. Fonte: adaptado de Clemens et al. (2002) e DalCorso et al. (2014).	162
<b>Figura 4.2</b> – Representação esquemática da absorção de elementos minerais (Me) pela raiz. Legenda: os iões metálicos podem a) ligar-se às cargas negativa da parede celular, b) ser transferidos via apoplasto ou c) ser transportados dentro da célula. Exemplo ilustrativo com as fitoquelatinas (FQ). Fonte: adaptado de Prasad (2004).	163
<b>Figura 4.3</b> – Curvas dose/resposta para um elemento essencial (a) e para um elemento não-essencial (b) para as plantas. Fonte: adaptado de Lin e Aarts (2012) e Alloway (2013).	165
<b>Figura 4.4</b> – Acumulação de metais pelas plantas em função da concentração de metal no exterior (A, B) e da área de absorção (C, D). Fonte: adaptado de Prasad (2004).	167
<b>Figura 4.5</b> – Mecanismos moleculares de resposta ao stresse induzido por EPTs nas plantas (a título ilustrativo, os elementos essenciais encontram-se assinalados a vermelho e os elementos não-essenciais estão a azul). Fonte: adaptado de Lin e Aarts (2012).	168
<b>Figura 4.6</b> – Concentração de EPT na planta em função da concentração de EPT exterior. Fonte: adaptado de Prasad (2004).	170
<b>Figura 4.7</b> – As duas cultivares de alface utilizadas neste ensaio com cultura sem solo. A- Alface DP; B-Alface M4E.	179
<b>Figura 4.8</b> – Representação esquemática do ensaio de avaliação da acumulação de EPTs.	181
<b>Figura 4.9</b> – Registo fotográfico dos ensaios instalados, na sala de crescimento, no Horto de Química Agrícola. A-desenvolvimento de plântulas ao fim de 16 dias em vermiculite; B- crescimento de plantas em hidroponia; C-plantas ao fim de 21 dias de crescimento (contaminação); D-plantas após 2 dias de contaminação.	182
<b>Figura 4.10</b> – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 5, 10, 15, 25 e 50 $\mu\text{M}$ de Cd.	188
<b>Figura 4.11</b> – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 5, 10, 15, 25 e 50 $\mu\text{M}$ de Cd.	189
<b>Figura 4.12</b> – Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface DP (a) e M4E (b) expostas a Cd durante 27 dias.	190
<b>Figura 4.13</b> – Concentração de Cd na parte aérea de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 5, 10, 15, 25 e 50 $\mu\text{M}$ de Cd.	194
<b>Figura 4.14</b> – Concentração de Cd em raiz de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 5, 10, 15, 25 e 50 $\mu\text{M}$ de Cd.	194
<b>Figura 4.15</b> – Concentração de Cd na parte aérea de plantas de alface M4E ao fim ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 5, 10, 15, 25 e 50 $\mu\text{M}$ de Cd.	195
<b>Figura 4.16</b> – Concentração de Cd em raiz de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 5, 10, 15, 25 e 50 $\mu\text{M}$ de Cd.	195



<b>Figura 4.17</b> – Percentagens de Cd absorvido na parte aérea de plantas de alface DP (a) e M4E (b) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 5 e 50 $\mu\text{M}$ de Cd ao longo do tempo de exposição ao contaminante (n=3). Na figura está representado o registo fotográfico obtido ao fim de 27 dias de exposição ao contaminante.....	198
<b>Figura 4.18</b> – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Cr. ....	201
<b>Figura 4.19</b> – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Cr. ....	202
<b>Figura 4.20</b> – Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface DP (a) e M4E (b) expostas a Cr durante 27 dias. ....	203
<b>Figura 4.21</b> – Concentração de Cr na parte aérea de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Cr. ...	206
<b>Figura 4.22</b> – Concentração de Cr na raiz de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Cr. ....	206
<b>Figura 4.23</b> – Concentração de Cr na parte aérea de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Cr. ...	207
<b>Figura 4.24</b> – Concentração de Cr na raiz de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Cr. ....	207
<b>Figura 4.25</b> – Percentagens de Cr na parte aérea de plantas de alface DP (a) e M4E (b) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 50 e 150 $\mu\text{M}$ de Cr ao longo do tempo de exposição ao contaminante (n=3). Na figura está representado o registo fotográfico obtido ao fim de 27 dias de exposição ao contaminante. ....	210
<b>Figura 4.26</b> – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Pb. ....	212
<b>Figura 4.27</b> – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Pb. Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface M4E (c) expostas a Pb durante 27 dias. ....	213
<b>Figura 4.28</b> – Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface DP (a) e M4E (b) expostas a Pb durante 27 dias. ....	214
<b>Figura 4.29</b> – Concentração de Pb na parte aérea de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Pb...	217
<b>Figura 4.30</b> – Concentração de Pb na raiz de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Pb.....	217
<b>Figura 4.31</b> – Concentração de Pb na parte aérea de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Pb. ....	218
<b>Figura 4.32</b> – Concentração de Pb na raiz de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Pb.....	218
<b>Figura 4.33</b> – Percentagens de Pb na parte aérea de plantas de alface DP (a) e M4E (b) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 50 e 150 $\mu\text{M}$ de Pb ao longo do tempo de exposição ao contaminante (n=3). Na figura	



está representado o registo fotográfico obtido ao fim de 27 dias de exposição ao contaminante.	222
<b>Figura 4.34</b> – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 10, 15, 25, 35 e 50 $\mu\text{M}$ de Cu.	225
<b>Figura 4.35</b> – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 10, 15, 25, 35 e 50 $\mu\text{M}$ de Cu.	226
<b>Figura 4.36</b> – Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface DP (a) e M4E (b) expostas a Cu durante 27 dias.	227
<b>Figura 4.37</b> – Concentração de Cu na parte aérea de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 10, 15, 25, 35 e 50 $\mu\text{M}$ de Cu.	230
<b>Figura 4.38</b> – Concentração de Cu na raiz de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 10, 15, 25, 35 e 50 $\mu\text{M}$ de Cu.	230
<b>Figura 4.39</b> – Concentração de Cu na parte aérea de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 10, 15, 25, 35 e 50 $\mu\text{M}$ de Cu.	231
<b>Figura 4.40</b> – Concentração de Cu na raiz de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 10, 15, 25, 35 e 50 $\mu\text{M}$ de Cu.	231
<b>Figura 4.41</b> – Percentagens de Cu na parte aérea de plantas de alface M4E em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 10 e 50 $\mu\text{M}$ de Cu ao longo do tempo de exposição ao contaminante (n=3). Na figura está representado o registo fotográfico obtido ao fim de 27 dias de exposição ao contaminante.	233
<b>Figura 4.42</b> – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{M}$ de Ni.	235
<b>Figura 4.43</b> – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{M}$ de Ni.	236
<b>Figura 4.44</b> – Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface DP (a) e M4E (b) expostas a Ni durante 27 dias.	237
<b>Figura 4.45</b> – Concentração de Ni na parte aérea de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{M}$ de Ni.	242
<b>Figura 4.46</b> – Concentração de Ni na raiz de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{M}$ de Ni.	242
<b>Figura 4.47</b> – Concentração de Ni na parte aérea de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{M}$ de Ni.	243
<b>Figura 4.48</b> – Concentração de Ni na raiz de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{M}$ de Ni.	243
<b>Figura 4.49</b> – Percentagens de Ni na parte aérea de plantas de alface DP (a) e M4E (b) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 50 e 200 $\mu\text{M}$ de Ni ao longo do tempo de exposição ao contaminante (n=3). Na figura está representado o registo fotográfico obtido ao fim de 27 dias de exposição ao contaminante.	245



<b>Figura 4.50</b> – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{M}$ de Zn.....	248
<b>Figura 4.51</b> – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{M}$ de Zn.....	249
<b>Figura 4.52</b> – Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface DP (a) e M4E (b) expostas a Zn durante 27 dias. ....	250
<b>Figura 4.53</b> – Concentração de Zn na parte aérea de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{M}$ de Zn. ....	253
<b>Figura 4.54</b> – Concentração de Zn na raiz de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{M}$ de Zn. ....	253
<b>Figura 4.55</b> – Concentração de Zn na parte aérea de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{M}$ de Zn.....	254
<b>Figura 4.56</b> – Concentração de Zn na raiz de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{M}$ de Zn. ....	254
<b>Figura 4.57</b> – Percentagens de Zn na parte aérea de plantas de alface DP (a) e M4E (b) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 50 e 200 $\mu\text{M}$ de Zn ao longo do tempo de exposição ao contaminante (n=3). Na figura está representado o registo fotográfico obtido ao fim de 27 dias de exposição ao contaminante. ....	257
<b>Figura 4.58</b> - Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos das duas cultivares de alface (DP e M4E), expostos às diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni ou Zn, ao fim de 2 (a,c) e 27 dias (b,d) de tratamento. Estas duas componentes explicam 77,89 % (a), 78,16 % (b), 79,10 % (c) e 78,56 % (d) da variabilidade.....	266





## Índice de Tabelas

<b>Tabela 4.1</b> – Concentrações de EPT aplicadas, para cada modalidade, no ensaio de avaliação da acumulação de ETPs com cultura sem solo. ....	180
<b>Tabela 4.2</b> – Cronograma dos ensaios realizados para a avaliação da acumulação de EPTs. ....	183
<b>Tabela 4.3</b> – Índice de tolerância de plantas de alface, DP e M4E, contaminadas com as diferentes concentrações de Cd, Cu, Cr, Pb, Ni ou Zn, ao fim de 2 dias de exposição a cada contaminante.....	260
<b>Tabela 4.4</b> - Índice de tolerância de plantas de alface, DP e M4E, contaminadas com as diferentes concentrações de Cd, Cu, Cr, Pb, Ni ou Zn, ao fim de 27 dias de exposição a cada contaminante.....	261
<b>Tabela 4.5</b> – Concentração de metal que inibe em 50 % o crescimento da raiz ( <i>LC50</i> ) de plantas de alface, DP e M4E, contaminadas com as diferentes concentrações de Cd, Cu, Cr, Pb, Ni ou Zn, ao fim de 2 dias de exposição a cada contaminante. ....	263
<b>Tabela 4.6</b> – Concentração de metal que inibe em 50 % o crescimento da raiz ( <i>LC50</i> ) de plantas de alface, DP e M4E, contaminadas com as diferentes concentrações de Cd, Cu, Cr, Pb, Ni ou Zn, ao fim de 27 dias de exposição a cada contaminante. ....	264
<b>Tabela 4.7</b> – Resumo da avaliação da acumulação de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni ou Zn em plantas de alface. ....	269





## Resumo

Neste capítulo é feita uma caracterização da acumulação de Cd, Cr, Ni, Cu, Ni ou Zn em função da concentração de EPT em solução nutritiva, e foram ajustados os modelos matemáticos que melhor traduzem este comportamento. Os ensaios realizaram-se com cultura sem solo e foram analisados diferentes parâmetros, nomeadamente, biomassa da parte aérea e da raiz, sintomas visíveis de toxicidade, teor de água e índice de tolerância.

A planta de alface poderá ser uma boa bioindicadora dos níveis de EPTs presentes, uma vez que manifesta visivelmente os seus efeitos adversos. O aumento de concentrações crescentes de EPT, ao longo do tempo, origina uma diminuição gradual na biomassa, resultado de uma maior acumulação do EPT. A parte aérea foi o órgão mais afetado e esta diminuição está relacionada com a interferência na absorção de água pela planta.

Nas duas cultivares, tanto na parte aérea como na raiz, a acumulação de Cd e Ni mostrou um comportamento hiperbólico, o Cr um comportamento polinomial e o Cu um comportamento linear. As plantas de alface acumularam uma elevada concentração de Pb nas raízes relativamente à parte aérea e o ajuste de modelos diferentes para parte aérea e raiz traduzem um comportamento de acumulação de Pb diferente para cada parte da planta. Também a acumulação de Zn nas duas cultivares, sugere diferentes comportamentos de parte aérea e raiz, a parte aérea apresenta um comportamento linear e a raiz segue um comportamento hiperbólico e polinomial, para a alface DP e M4E, respetivamente. Os ajustes ao modelo hiperbólico sugerem um comportamento compatível com uma planta acumuladora, enquanto que os ajustes ao modelo polinomial sugerem um comportamento de uma planta exclusora, embora não seja possível assumir esta designação apenas com estes resultados.

A acumulação de EPTs é bastante superior na raiz. O Cu, Cr e Pb são os elementos menos translocados para a parte aérea da planta, ao contrário do que se verifica para o Cd, Ni e Zn.

A planta jovem demonstra ser mais tolerante à presença destes EPTs dado que foi observado um menor efeito destes elementos nos parâmetros estudados. Na planta adulta, o efeito de cada EPT pode ser descrito pela seguinte ordem para os elementos não essenciais  $Cr > Cd > Pb$  (alface DP, M4E), e para os elementos essenciais:  $Ni > Cu > Zn$  (alface DP) e  $Ni > Zn > Cu$  (alface M4E). A alface M4E demonstra ser menos tolerante à presença destes EPTs (IT,  $LC_{50}$ ), acumulando uma quantidade superior de EPTs (Cd, Cr, Ni, Zn) nos seus tecidos e tendo um efeito mais intenso na diminuição da biomassa, o que sugere a existência de uma resposta metabólica específica.



## Capítulo IV - AVALIAÇÃO DA ACUMULAÇÃO DE EPTs

### 4.1. Objetivo

Com este Capítulo pretende-se caracterizar o comportamento que as duas cultivares de alface apresentam em relação à acumulação de diferentes EPTs na parte aérea e na raiz. Neste sentido, vai ser realizada uma caracterização da acumulação de Cd, Cu, Cr, Pb, Ni ou Zn em diferentes fases de desenvolvimento da planta e continuamente expostas a diferentes concentrações destes elementos. Para este efeito serão ajustados modelos matemáticos que permitam obter uma descrição do processo de acumulação para cada um dos EPTs em função da concentração presente em solução nutritiva.

Serão ainda avaliados os efeitos dos EPTs no crescimento e aspeto exterior das plantas. A avaliação da toxicidade induzida por cada EPTs irá permitir verificar se existem diferenças entre as duas cultivares em estudo.

### 4.2. Introdução

As plantas precisam de um equilíbrio complexo de nutrientes para crescer e se reproduzir de forma eficiente, que são mobilizados a partir do solo e absorvidos pela raiz. Existem 14 elementos minerais que são essenciais para todas as plantas. O azoto (N), fosforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), enxofre (S) e magnésio (Mg) são necessários em quantidades relativamente elevadas (existindo na planta em concentrações superiores a 1000 mg kg<sup>-1</sup> MS) e são definidos como macronutrientes. Elementos como o cloro (Cl), ferro (Fe), boro (B), Ni, Cu, Mn, Zn e molibdénio (Mo) são necessários em baixas quantidades (existindo na planta em concentrações inferiores a 100 mg kg<sup>-1</sup> MS) e considerados como micronutrientes. Para além destes elementos essenciais, as plantas em meios contaminados podem ter que lidar com elementos não essenciais, como por exemplo, o arsénio (As), mercúrio (Hg), prata (Ag), Cd, Pb e urânio (U) que podem ser potencialmente tóxicos (DalCorso et al., 2014). No ambiente, as plantas são desafiadas a sobreviver em meios com concentrações variáveis destes iões metálicos e a desenvolveram mecanismos para lidar com a sua presença. Uma vez absorvidos pelas raízes, os iões metálicos são distribuídos pelas diferentes partes da planta através dos seus tecidos vasculares.

Em resposta à presença de um metal tóxico, as plantas desencadeiam diversos mecanismos específicos de defesa. Estes mecanismos podem ser de dois tipos: (i) mecanismos externos em que há a exclusão e restrição dos metais por absorção seletiva devido ao aumento da



produção e excreção de agentes de sequestração e de acidificação na rizosfera, levando a alterações morfológicas e adaptações anatômicas e (ii) mecanismos internos que incluem estratégias de imobilização, complexação e compartimentação no interior da célula. Estes mecanismos atuam na restrição do transporte do metal no interior da planta e promovem alterações no metabolismo celular.

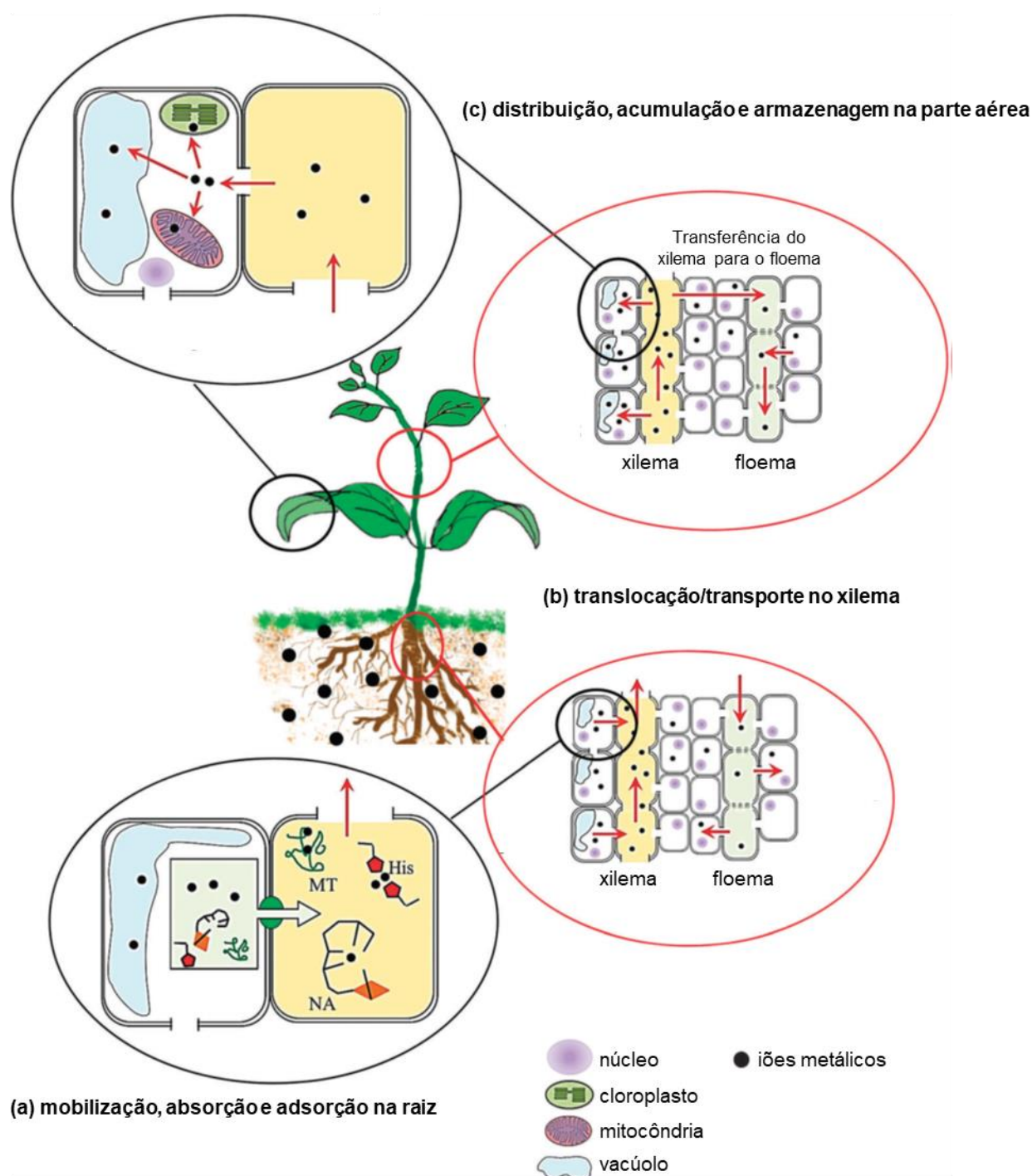
#### 4.2.1. Absorção de elementos minerais pela planta

As plantas apresentam estratégias adaptativas não apenas para absorverem quantidades suficientes de macronutrientes e micronutrientes essenciais, mas também para evitar a sua acumulação excessiva, que poderá ser tóxica. Assim, as plantas ativam mecanismos homeostáticos que permitem o controle da absorção e distribuição de elementos metálicos nos seus tecidos (Clemens, 2001). Esta regulação é feita de modo a responder de acordo com as suas necessidades diárias em nutrientes para o crescimento e desenvolvimento e de forma a evitar a acumulação de elementos não essenciais e níveis tóxicos de elementos essenciais.

A acumulação de elementos metálicos nas células das plantas ocorre através da mobilização e absorção destes elementos a partir da solução do solo. Posteriormente, estes elementos são sequestrados na raiz, carregados no xilema, transportados até à parte aérea e, finalmente, distribuídos e acumulados nas células da planta (Singh et al., 2016). Cada etapa requer a interação complexa de compostos quelantes e transportadores de metais que afetam a taxa de acumulação do elemento (Clemens et al., 2002) (**Figura 4.1**).

Embora algumas substâncias, como  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  e  $\text{NO}_2$  possam ser absorvidos na forma de gases através dos estomas e metabolizados diretamente pelas folhas (Vallano e Sparks, 2008; Yang et al., 2006), a maioria dos nutrientes são absorvidos pelas raízes.

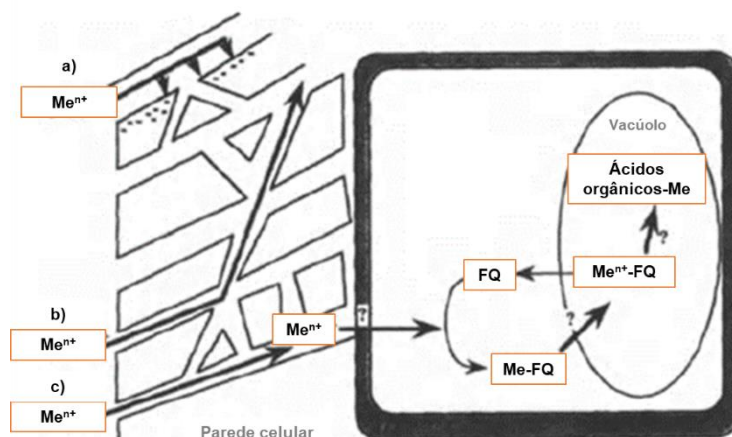
A absorção pela raiz pode ocorrer através da zona apical ou da superfície específica da raiz e, deste modo, depende da capacidade de absorção da planta e da área radicular. As plantas desenvolveram uma série de estratégias para aumentar a absorção de elementos, incluindo a acidificação, a secreção de quelantes orgânicos e o aumento da expressão de transportadores com elevada afinidade para os metais. O primeiro desses mecanismos envolve a libertação de prótons na rizosfera, para aumentar a solubilização de cátions.



**Figura 4.1** – Esquema representativo dos mecanismos envolvidos na absorção e transporte de elementos na planta. Em (a), após a absorção, os elementos são transportados pelo xilema na sua forma livre ou em formas conjugadas. Através do fluxo da água, os íons são transportados até à parte aérea, saindo do xilema (b). Nas células da parte aérea, os íons são distribuídos pelas células (c). Uma pequena fração pode ser novamente transferida, através do floema, até ao tecido radicular. Fonte: adaptado de Clemens et al. (2002) e DalCorso et al. (2014).



Uma vez solubilizados, os elementos metálicos podem entrar na raiz via apoplasto (sem entrar no interior das células) ou via simplasto (quando uma fração desse metal é transportada para dentro das células), podendo ainda outra fração ficar adsorvida às paredes celulares das raízes (**Figura 4.2**) (Prasad, 2004).



**Figura 4.2** – Representação esquemática da absorção de elementos minerais (Me) pela raiz. Legenda: os íons metálicos podem a) ligar-se às cargas negativa da parede celular, b) ser transferidos via apoplasto ou c) ser transportados dentro da célula. Exemplo ilustrativo com as fitoquelatinas (FQ). Fonte: adaptado de Prasad (2004).

Parte dos elementos metálicos que entraram via apoplasto são transportados através da membrana plasmática até ao citoplasma. A membrana plasmática tem a particularidade de concentrar os nutrientes e, embora de forma não completa, excluir os elementos tóxicos. Como os elementos não essenciais podem apresentar maior toxicidade, é necessário haver uma barreira à sua entrada, nomeadamente a sua retenção às paredes celulares ou por quelatação com aminoácidos (como a histidina, His), ácidos orgânicos (como o citrato), quelantes de metais como a nicotianamina (NA) e/ou péptidos de ligação a metais como, as fitoquelatinas (FQ) e as metalotioneínas (MT) (DalCorso et al., 2013; Gallego et al., 2012). Estas moléculas solúveis presentes no citoplasma formam complexos com os elementos metálicos e podem facilitar o seu transporte para dentro do vacúolo. Estes complexos não se formam apenas com os elementos essenciais uma vez que não são específicos, pelo que este mecanismo também se pode aplicar aos elementos não essenciais.

Uma vez que existem elementos essenciais ao normal desenvolvimento da planta, a sua absorção tem de ser regulada. Nas plantas, os minerais usam transportadores proteicos para entrar nas células, que garantem um mecanismo sofisticado de homeostase para lidar com as alterações na disponibilidade de nutrientes (Migeon et al., 2010).





Contudo, como os elementos não essenciais não apresentam função biológica conhecida nas plantas, não existem transportadores específicos, e estes elementos têm a capacidade de entrar nas células por difusão simples ou facilitada, ou seja, com os mesmos sistemas de transporte que os elementos essenciais, uma vez que apresentam propriedades químicas semelhantes. Diferentes quelantes de metais estão também envolvidos nas várias etapas de absorção de micronutrientes, transporte interno e sequestração no citosol ou em compartimentos subcelulares (Hall e Williams, 2003; Haydon e Cobbett, 2007).

A maioria das famílias de transportadores de elementos metálicos podem estar incluídas nas (i) famílias necessárias para o sequestro de metais no citosol (influxo) e (ii) famílias necessárias para a remobilização de metal no citosol (efluxo) (Colangelo e Guerinot, 2006). Os quelantes de metais são conhecidos por desempenharem um papel no transporte de longa distância e destoxificação, evitando desequilíbrios nutricionais causados por um excesso ou deficiência de um determinado elemento essencial. Neste sentido, foram identificadas e caracterizadas várias moléculas quelatantes e transportadoras de cátions: famílias ZIP (*Zinc Regulated Transporter*, ZRT; *like protein*, *Iron Regulated Transporter*, IRT), NRAMP (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*) e CTR/COPT (*COpper TRansporter*), que desempenham um papel primordial na absorção e remoção de metal dos compartimentos intracelulares no citosol (DalCorso et al., 2014; Flora et al., 2008; Fox e Guerinot, 1998; Gallego et al., 2012; Mizuno et al., 2005; Vert et al., 2002; Williams et al., 2000). Existem ainda outras famílias que incluem as ATPases que fazem o transporte de metais pesados (*Heavy Metal ATPases*, HMAs), facilitadores de difusão de cátions (*Cation Diffusion Facilitator*, CDF), permutadores de cátions (*CAtion Exchanger*, CAX) e extrusão de múltiplas drogas e compostos tóxicos (*Multi-drug And Toxic compound Extrusion*, MATE) e de resistência ao cádmio da planta (*Plant Cadmium Resistance*, PCR), YSL (*Yellow Stripe-Like family*) e as ferroportinas (*FerroPortiN*, FPN) (Colangelo e Guerinot, 2006; Migocka et al., 2015; Montanini et al., 2007; Wong, 2009; Wu et al., 2011).

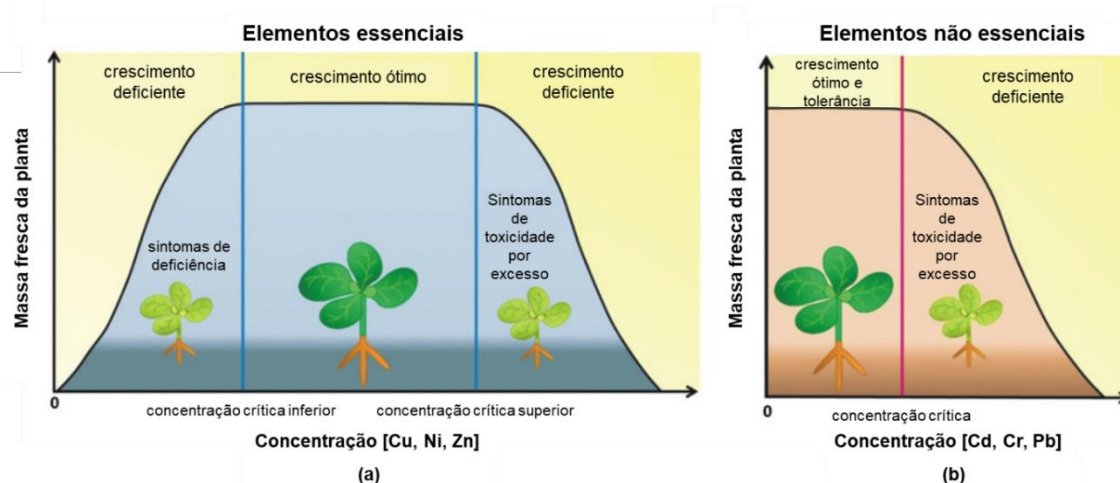
Após entrarem no apoplasto da raiz, os cátions podem ser sequestrados pelas células da raiz ou posteriormente transportados no xilema. Normalmente, para a maioria dos EPTs, este transporte no xilema é restrito, devido à retenção destes elementos nas raízes evitando a sua translocação para a parte aérea, podendo ficar retidos no apoplasto ou ligados às paredes celulares das raízes. Por essa razão, são encontradas maiores concentrações destes elementos neste órgão da planta que na parte aérea.

O transporte dos elementos metálicos até à parte superior da planta é feito pelo xilema e a translocação é promovida pelo fluxo de transpiração que, portanto, conduz a seiva do xilema



para a parte aérea, onde os metais podem ser distribuídos pelos tecidos. A nível celular, os metais são distribuídos por quase todos os compartimentos subcelulares. A concentração no citosol dos metais *redox* ativos deve ser rigorosamente controlada para evitar a produção de ROS (esta definição irá ser abordada no **Capítulo V**). Assim, a formação de quelatos desempenha um papel muito importante na proteção da planta. Os vacúolos de células das plantas têm uma baixa atividade metabólica, em comparação com outros organelos e, portanto, são adequados como compartimentos de armazenagem e de acumulação de metabolitos e nutrientes. Para além disso, o vacúolo também atua como uma reserva para elementos não essenciais (Küpper e Leitenmaier, 2013).

As curvas dose-resposta diferem quer se trate de um elemento essencial ou não essencial (**Figura 4.3**). Por este motivo, é conveniente caracterizar os metais pesados em dois grupos: os denominados de micronutrientes que são elementos essenciais para o crescimento da planta e os elementos não essenciais.



**Figura 4.3** – Curvas dose/resposta para um elemento essencial (a) e para um elemento não-essencial (b) para as plantas. Fonte: adaptado de Lin e Aarts (2012) e Alloway (2013).

Os micronutrientes, como o Cu, Ni e Zn são considerados essenciais porque estão envolvidos em diversas funções fisiológicas essenciais, incluindo o metabolismo energético, defesa primária e secundária metabólica, regulação de genes e atividades enzimáticas, perceção hormonal, transdução de sinal e reprodução, e estimulam o desenvolvimento ótimo da planta (Hänsch e Mendel, 2009). Na planta, a presença de elevadas concentrações de elementos benéficos indicam um papel estrutural ou osmótico, enquanto que baixas concentrações sugerem que o elemento funciona como um cofator de enzimas específicas, muitas vezes envolvidas na resistência ao stresse abiótico ou biótico (Pilon-Smits et al., 2009).



Devido à sua importância na fisiologia da planta, é fundamental manter a homeostase destes elementos essenciais nas células. Isto significa que as concentrações destes elementos metálicos devem ser mantidas dentro de uma gama de concentrações que evitem efeitos de deficiência e toxicidade. As plantas possuem rigorosos mecanismos de regulação de forma a manter esta homeostase de micronutrientes. Porém, quando esse mecanismo atinge sua capacidade máxima, e as concentrações de elementos essenciais aumentam acima de uma determinada concentração crítica, e podem manifestar-se sintomas de toxicidade nas plantas (Appenroth, 2010). A presença destes elementos com atividade *redox*, pode ser prejudicial, uma vez que têm a capacidade de induzir a formação das ROS, que são moléculas potencialmente tóxicas devido à sua capacidade oxidante nas células e elevada reatividade. Por outro lado, uma fonte inadequada de micronutrientes pode causar sintomas de deficiência, o que tem influência direta nas funções fisiológicas essenciais, manifestando-se num fraco crescimento e morfologia anormal da planta.

Os elementos não essenciais, como o Cd, Cr e Pb, não são necessários para o crescimento normal da planta e, por esse motivo, não existe numa concentração crítica mínima para este tipo de elementos. Estes elementos não apresentam uma função biológica conhecida, e são geralmente tóxicos para as plantas (Jarup, 2003). Estes elementos metálicos não essenciais induzem a produção das ROS e provocam uma resposta da planta, mesmo quando presentes apenas em baixas concentrações (Appenroth, 2010). O mecanismo de resposta para excluir, destoxificar ou armazenar este tipo de elementos desempenha um papel crucial na sobrevivência das plantas sob exposição a estas concentrações críticas. Por consequência, a nível celular, as plantas utilizam uma ou mais das seguintes formas para evitar ou suportar a exposição ao elemento não essencial: (i) reduzir a biodisponibilidade do metal; (ii) controlar o influxo de metal; (iii) quelatar metais; (iv) promover o efluxo de metal; (v) distribuir, acumular e sequestrar/armazenar os metais em vacúolos; (vi) eliminar as ROS induzida pela sua presença (Hall, 2002).

#### 4.2.2. Acumulação de metais pesados pelas plantas

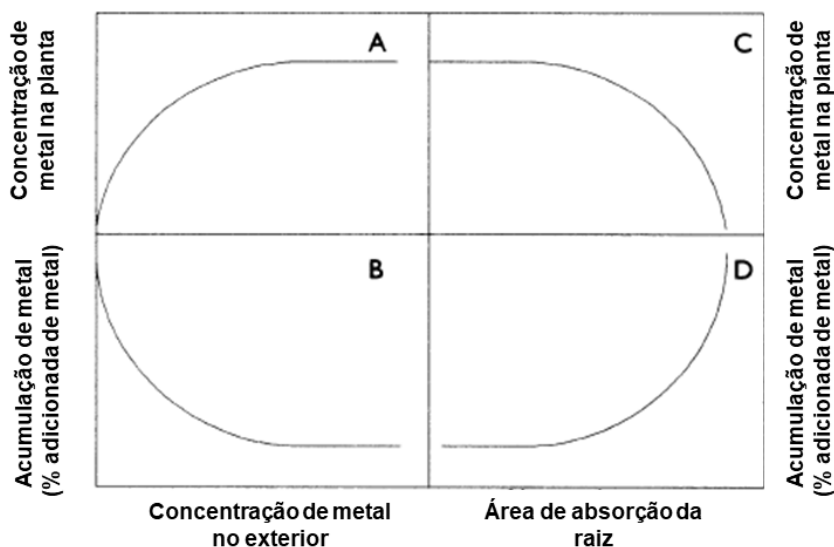
A toxicidade dos metais pesados para as plantas depende da espécie da planta e das condições de crescimento, tais como, o seu estado de desenvolvimento, a concentração disponível, o tempo de exposição, a forma química como o metal é aplicado, o meio de cultura e as condições ambientais (Hasanuzzaman et al., 2012).

Segundo Prasad (2004), a acumulação de metais, pelas raízes e folhas, em função da concentração de metal presente no meio exterior está representada nas **Figuras 4.4-A e**



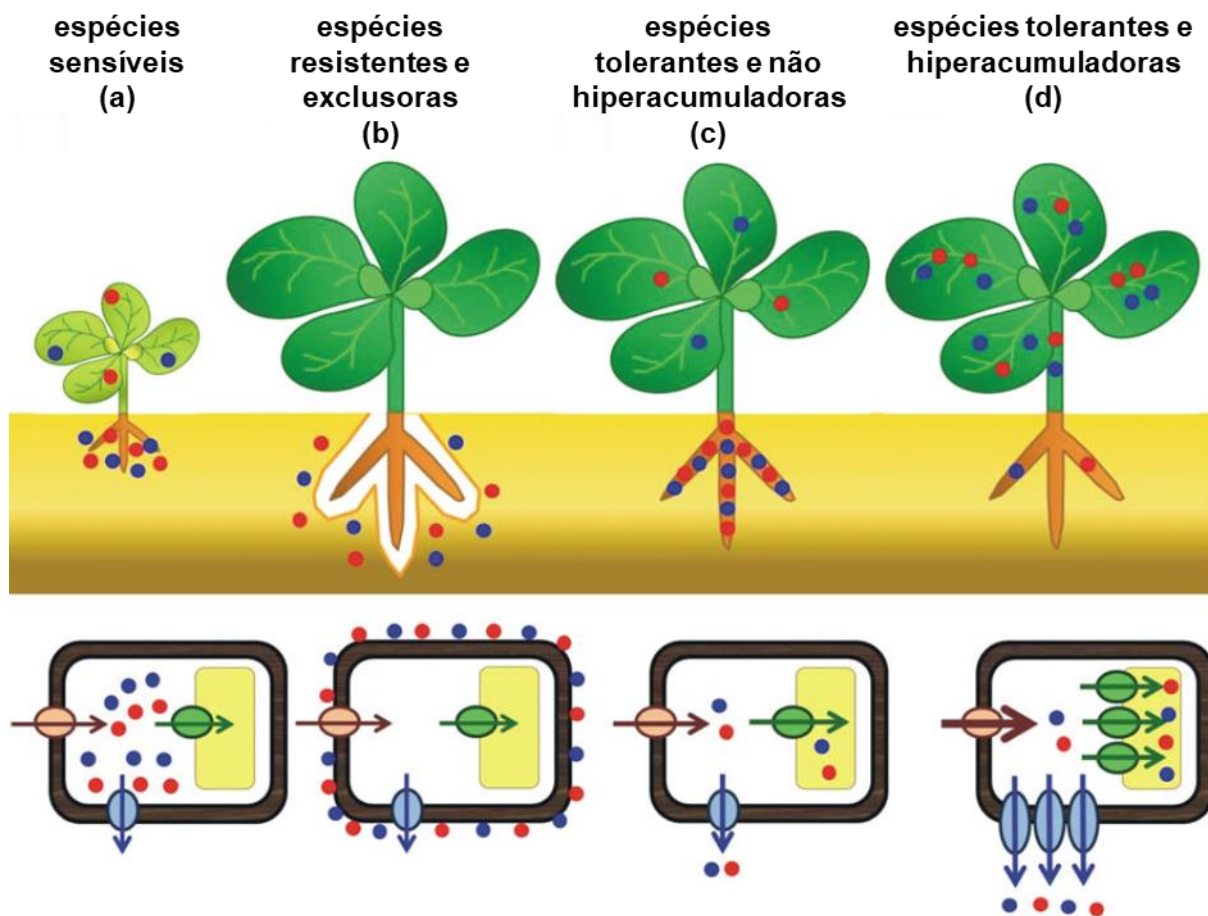
**4.4-B.** Normalmente, a acumulação destes elementos não apresenta um comportamento linear com o aumento da concentração de metal presente em solução (**Figura 4.4-A**). Isto deve-se ao facto de os metais estarem ligados aos tecidos, causando uma saturação que é mediada pela taxa a que o elemento é absorvido. A eficiência da acumulação é maior quando existem concentrações baixas de metais no exterior (**Figura 4.4-B**), uma vez que neste caso existe pouca competição dos iões nos locais de absorção, enquanto em meios com elevadas concentrações isso já acontece.

A influência da área de absorção na acumulação de um elemento pode ser observada nas **Figuras 4.4-C e 4.4-D**. Nas representações gráficas está a concentração de metal na planta em função do aumento da área de absorção da raiz (massa da raiz). Assim, quanto maior o tamanho da raiz, supostamente mais efetiva é a acumulação do elemento (**Figura 4.4-D**). No entanto, devido ao efeito biológico de diluição, a concentração de metal nos tecidos vai diminuir com o aumento da biomassa da raiz (**Figura 4.4-C**).



**Figura 4.4** – Acumulação de metais pelas plantas em função da concentração de metal no exterior (A, B) e da área de absorção (C, D). Fonte: adaptado de Prasad (2004).

As diferentes espécies de plantas apresentam diferentes estratégias na resposta induzida pela presença de um EPT. Por este motivo, a acumulação de metais na planta em função da concentração de metais no exterior pode diferir conforme as plantas são distinguidas em: (i) espécies sensíveis ou indicadoras da presença de metais, (ii) espécies resistentes e exclusoras de metais, (iii) espécies tolerantes e não hiperacumuladoras e (iv) espécies tolerantes e hiperacumuladoras (Lin e Aarts, 2012; Peralta-Videa et al., 2009; Prasad, 2004; Rascio e Navari-Izzo, 2011; Sytar et al., 2013) (**Figura 4.5**).



**Figura 4.5** – Mecanismos moleculares de resposta ao stress induzido por EPTs nas plantas (a título ilustrativo, os elementos essenciais encontram-se assinalados a vermelho e os elementos não-essenciais estão a azul). Fonte: adaptado de Lin e Aarts (2012).

As plantas caracterizadas como sensíveis não conseguem evitar a absorção dos elementos metálicos nas suas raízes e prevenir o seu transporte para a parte aérea. Neste caso, estas plantas não conseguem resistir à presença destes elementos, ou seja, a concentração interna destes elementos reflete-se pelo aparecimento de danos exteriores, podendo mesmo desencadear a sua morte (**Figura 4.5-a**).

As plantas resistentes e exclusoras têm a capacidade de manter os elementos metálicos fora das raízes ou promover um rápido efluxo destes elementos caso entrem na raiz. Estas plantas têm a particularidade de apresentar uma baixa absorção do metal, mesmo que as concentrações no meio sejam altas (**Figura 4.5-b**).

Nas plantas tolerantes e não hiperacumuladoras, ou também conhecidas por acumuladoras, os metais podem entrar nas células das raízes, onde são sequestrados/armazenados nos vacúolos radiculares, prevenindo a sua translocação para a parte aérea (**Figura 4.5-c**).

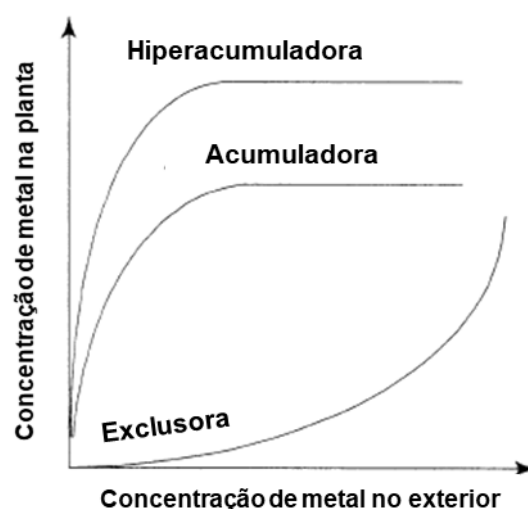


As plantas tolerantes e hiperacumuladoras, absorvem ativamente os metais através das raízes, posteriormente, uma grande fração é transportada no xilema até à parte aérea. Na parte aérea, os metais são sequestrados, em segurança, nos vacúolos. As plantas hiperacumuladoras são plantas acumuladoras extremas. Estas plantas acumulam concentrações elevadas de metal, mesmo que as concentrações exteriores sejam baixas e apresentam mecanismos de destoxificação muito eficientes que permitem à planta acumular elevadas concentrações de metal (**Figura 4.5-d**). Cada espécie apresenta um mecanismo característico de resistência face ao stresse induzido pelo elemento metálico ou para diminuir os efeitos negativos desencadeados pela sua toxicidade. Os mecanismos utilizados na homeostase nas células das plantas envolvem os transportadores de influxo e efluxo referidos anteriormente.

Uma planta hiperacumuladora pode ser definida como uma planta que cresce na natureza (ou seja, não em condições controladas) e cujas folhas contêm um elemento metálico com uma concentração que excede um limite específico. Esta concentração presente nas folhas deve ter uma ordem de grandeza muito maior (2-3 vezes) do que as folhas da maioria das espécies que crescem em solos normais e pelo menos uma ordem de grandeza superior às folhas de plantas que crescem em solos metalíferos. Com base nestes conceitos, os limites específicos propostos são:  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  MS para Cd;  $300 \mu\text{g g}^{-1}$  MS para Cr e Cu;  $1000 \mu\text{g g}^{-1}$  MS para Ni e Pb;  $3000 \mu\text{g g}^{-1}$  MS para Zn (Cheruiyot et al., 2013; Ent et al., 2013; Pollard et al., 2014).

Na **Figura 4.6** encontra-se uma representação gráfica que relaciona a concentração de EPT acumulada na planta em função da concentração de EPT presente no meio exterior, evidenciando os três comportamentos distintos de plantas exclusoras, acumuladoras e hiperacumuladoras.





**Figura 4.6** – Concentração de EPT na planta em função da concentração de EPT exterior. Fonte: adaptado de Prasad (2004).

A alface é uma espécie frequentemente utilizada em estudos experimentais de fitotoxicidade (Bagur-González et al., 2011; Smith et al., 2013; Valerio et al., 2007), sendo considerada uma boa bioindicadora do estado dos solos (Charles et al., 2011; Nali et al., 2004).

Para além da biodisponibilidade de um elemento metálico, existem dois processos que determinam o nível de exposição e a acumulação na planta: a atividade de absorção do elemento e a eficiência na sua translocação. Pode-se assumir que apenas os iões metálicos que entram nas células radiculares podem exercer efeitos tóxicos e provocar efeitos visíveis de toxicidade nesse órgão, assim como aqueles elementos que são translocados para a parte aérea e aí ter o mesmo efeito nas células foliares (Clemens, 2006). De acordo com a sua acumulação, na raiz e na parte aérea, os elementos metálicos podem ser divididos em três grupos: (i) os elementos que normalmente são acumulados mais na raiz do que na parte aérea, como Cd, Fe, Cu, Co e Mo; (ii) os elementos que se acumulam maioritariamente nas raízes, apresentando baixas concentrações na parte aérea, como Pb, Ag, Cr; (iii) os elementos que são uniformemente distribuídos nas raízes e na parte aérea, como Zn, Mn, Ni (Siedlecka, 1995).

Os sintomas de toxicidade nas plantas podem variar conforme esteja presente um elemento essencial ou não essencial, mas alguns sintomas visíveis tendem a ser normalmente encontrados. Estes sintomas são a diminuição na biomassa total das plantas, com o consequente atraso no crescimento, acastanhamento e morfologia deformada de raízes, e o aparecimento de cloroses e necroses nas folhas (Alloway, 2013).





Segundo Rucińska-Sobkowiak (2016), um excesso de iões metálicos pode afetar a absorção de água pela planta. Esta entrada de água é influenciada indiretamente por vários fatores que são também afetados pelo efeito tóxico dos EPTs, nomeadamente, uma diminuição da elongação da raiz primária e do crescimento das raízes secundárias, que por consequência, afetam a área de absorção da raiz e a absorção de água.

Este déficit hídrico na raiz devido à presença de metais resulta também na diminuição da velocidade de transferência de água, tanto via simplasto como via apoplasto, que por sua vez reduzem o movimento da água no sistema vascular e, consequentemente, o fornecimento de água à parte aérea. Os metais pesados também afetam a quantidade de água que chega à parte aérea devido à inibição de transpiração porque diminuem, entre outros, o tamanho das folhas e a abertura dos estomas.

#### 4.2.3.1. Cádmio

O Cd é facilmente absorvido pelas raízes e eficientemente translocado para outros órgãos da planta, como as folhas ou frutos. No entanto, é comum haver uma maior quantidade de Cd nas raízes, do que nas folhas, e ainda menor nas frutas ou sementes (Wagner, 1993). Esta é a razão pela qual as maiores fontes de ingestão de Cd na alimentação são as culturas em que a parte edível corresponde à raiz e os vegetais de folha em que ocorre translocação para a parte aérea, ou ainda como o caso do tabaco em que o Cd nas folhas constitui uma origem de contaminação para os fumadores (Clemens et al., 2013; Lugon-Moulin et al., 2004; Martins et al., 2014).

O Cd pode facilmente atravessar o sistema radicular através da via apoplástica ou via simplástica e alcançar a parte aérea da planta (Lin e Aarts, 2012). A presença de uma quantidade excessiva de elementos não essenciais, como o Cd, é normalmente absorvida através dos mesmos transportadores ou canais que permitem a absorção e transporte de elementos essenciais.

A disponibilidade de nutrientes pode ser afetada pela presença de Cd, levando a uma diminuição na sua absorção. Por este motivo, é frequente a ocorrência de deficiências nas plantas contaminadas com Cd, devido à falta de outros nutrientes. Neste sentido, o Cd compete pela absorção de vários nutrientes que apresentam propriedades químicas semelhantes, como o Ca, Mg ou o Zn, entre outros (Barcelo e Poschenrieder, 1990). O Cd é um antagonista do Zn e Cu, e também compete com os canais/transportadores de Fe e Ca para atravessar o citoplasma. Tem sido referido que as plantas acumulam uma grande



variedade de cátions em condições de deficiência em Fe, incluindo o Cd (Wuana e Okieimen, 2011). Uma quantidade excessiva de Zn ou Ca, tem um efeito protetor contra a toxicidade provocada por Cd, devido à competição entre estes elementos na absorção (Leitenmaier et al., 2011). Neste sentido, o Cd pode ser transportado através dos vários transportadores de Fe e Zn, conhecida pela família das ZIPs (ZRT, IRT) (Connolly et al., 2002; Hall e Williams, 2003), bem como as NRAMP e os canais de Ca que também facilitam a absorção de Cd no citoplasma. Parte do Cd é complexado nas paredes celulares do apoplasto das raízes, enquanto a maior parte é sequestrado nos vacúolos das raízes ou folhas adultas (Irfan et al., 2013).

Quando a absorção de Cd ocorre nas raízes, este é o primeiro órgão em contacto direto com o metal. Na raiz, grande parte do Cd fica retido, ligado às paredes celulares ou a quelatos sendo posteriormente armazenado nos vacúolos, o que justifica encontrarem-se maiores concentrações de Cd nas raízes relativamente à parte aérea. O Cd pode provocar a diminuição do crescimento radicular, por inibição da divisão e alongamento celular, bem como alterações morfológicas da raiz, devido à proliferação anormal de células (Mohamed et al., 2012; Sanita di Toppi e Gabbrielli, 1999). Algumas destas alterações são a diminuição das ramificações radiculares e a variação da coloração radicular, ocorrendo um acastanhamento devido à lenhificação e à atividade de algumas enzimas, como as polifenoloxidasas (PPO) (Martins et al., 2013; Sandalio et al., 2001). Estas modificações podem originar alterações na absorção de água e nutrientes essenciais, não só devido à diminuição do sistema radicular, que fica menos eficiente, como através da alteração do potencial da membrana, provocando a diminuição da elasticidade celular (Meharg, 1993).

A nível foliar, um dos principais alvos do Cd é o sistema fotossintético, interferindo, direta ou indiretamente, com os seus componentes (Mohamed et al., 2012; Vassilev et al., 2004). A diminuição na taxa fotossintética está relacionada com a redução da área foliar, diminuição da síntese de pigmentos fotossintéticos, alterações na atividade dos estomas provocando uma redução nas trocas gasosas e diminuição na taxa de transpiração das plantas (Barcelo e Poschenrieder, 1990; Ekmekci et al., 2008). Estas alterações morfológicas estão fortemente relacionadas com uma menor translocação de elementos essenciais para a parte superior das plantas (Hasanuzzaman et al., 2012), o que pode levar à diminuição da biomassa da parte aérea (Mohamed et al., 2012), bem como causar sintomas visíveis de toxicidade, tais como: o aparecimento de cloroses, necroses, enrolamento de folhas, desenvolvimento atrofiado das plantas e inibição do crescimento radicular (Gill et al., 2012; Guo et al., 2008; Mohanpuria et al., 2007; Monteiro et al., 2009; Nouairi et al., 2006; Sanita di Toppi e Gabbrielli, 1999; Wojcik e Tukiendorf, 2004). Por estas razões a inibição do crescimento da planta é um parâmetro



usualmente utilizado para avaliação do stresse induzido por este elemento (An, 2004; Linger et al., 2005) e um parâmetro recomendado em testes padrão para avaliação de toxicidade (ISO, 1993; OECD, 2006).

#### 4.2.3.2. Crómio

Uma vez absorvido pelas raízes, a translocação do Cr das raízes para a parte aérea é muito lenta (Liu et al., 2008; Scoccianti et al., 2006). Uma razão importante para o aumento de acumulação de Cr nas raízes deve-se à presença de ácidos orgânicos nos exsudados das raízes que formam complexos com o Cr, e por isso, disponíveis para serem absorvidos pela raiz.

Ao contrário de outros EPTs, o Cr é muito pouco translocado para outros órgãos, e forma compostos insolúveis que se imobilizam nos vacúolos das células radiculares (Hayat et al., 2012; Nematshahi et al., 2012; Oliveira, 2012) tornando-o menos tóxico. Normalmente, a quantidade máxima é acumulada nas raízes, seguida das folhas e depois os frutos (Kumar e Maiti, 2013). As raízes, regra geral, acumulam uma quantidade de Cr 100 vezes superior à parte aérea (Zayed et al., 1998).

Nas plantas, a entrada de Cr, a sua sequestração e consequente distribuição nas células foi descrita, detalhadamente, por Singh et al. (2013). O Cr pode ser absorvido como  $\text{Cr}^{3+}$  ou  $\text{Cr}^{6+}$ , mas não existe um mecanismo específico para a sua absorção, sendo absorvido por transportadores não específicos utilizados na absorção de nutrientes essenciais e água (Shanker et al., 2005). O  $\text{Cr}^{3+}$  é absorvido de forma passiva através de difusão simples nos locais de troca catiónica na parede celular. Por outro lado, o  $\text{Cr}^{6+}$  é transportado de forma ativa pelos transportadores de sulfato e é imediatamente convertido em  $\text{Cr}^{3+}$  nas raízes através de redutases férricas (Singh et al., 2013).

A presença de Cr também interfere com a disponibilidade de outros nutrientes. O Fe, S e P competem com o Cr pelo mesmo transportador (Hayat et al., 2012). Num estudo realizado com plantas da família das brássicas verificou-se que estas contêm grandes quantidades de moléculas com grupos de enxofre e têm uma tendência para acumular uma elevada quantidade de Cr, sugerindo que o Cr é translocado nas plantas pelos mesmos transportadores do S (Cervantes et al., 2001). Isto provavelmente ocorre devido à similaridade entre estes dois elementos. Deste modo, a presença de S em solução nutritiva diminui a absorção de Cr pelas plantas porque ambos competem pelo mesmo transportador. O Cr interage positivamente com a presença de Fe nas plantas. Tem sido observado que as plantas



acumuladoras de Fe, como o espinafre (*Spinacia oleracea*) e nabo (*Brassica rapa rapa*), são plantas que translocam uma maior quantidade de Cr para a parte aérea da planta, ao contrário de outras plantas como a alface (*Lactuca sativa*) e couve (*Brassica oleracea var. capitata*) que acumulam uma menor quantidade de Fe, comparativamente às anteriores, e por isso, são menos efetivas no transporte de Cr (Singh et al., 2013).

Uma vez que as raízes são o primeiro órgão em contacto com o Cr, o seu crescimento é muito afetado, comparativamente aos outros EPTs. Esta diminuição no crescimento da raiz deve-se à inibição da divisão celular, do crescimento ou do alongamento mas também pode resultar da alteração no transporte de Ca através da membrana plasmática para o citoplasma, que leva ao desequilíbrio de iões Ca nas células, provocando distúrbios na atividade fisiológica (Shanker et al., 2005). Sob elevadas concentrações de Cr, a diminuição do crescimento da raiz deve-se ao contacto direto com o metal no meio, e consequente incapacidade das raízes em absorver a água e outros nutrientes (Hayat et al., 2012).

A nível foliar, o Cr causa diminuição do desenvolvimento da parte aérea, caules e folhas, tendo como consequência uma diminuição na biomassa, o que leva a um baixo rendimento da cultura (Nematshahi et al., 2012). A redução na altura da planta deve-se ao baixo crescimento da raiz e, consequentemente, à diminuição na absorção elementos benéficos e o seu transporte para a parte superior das plantas (Liu et al., 2008; Srivastava e Jain, 2011; Sundaramoorthy et al., 2010; Zivkovic et al., 2012). Outros sintomas visíveis de toxicidade induzida pela presença de Cr incluem a indução de cloroses e necroses nas folhas.

#### 4.2.3.3. Chumbo

Uma vez que o Pb é absorvido pelo sistema radicular, pode-se acumular nas raízes ou ser translocado para a parte aérea das plantas. Em muitas plantas, a maior parte do Pb absorvido é usualmente acumulado nas raízes e apenas uma pequena parte é translocada para a parte aérea (Pourrut et al., 2011). Regra geral, a concentração de Pb nos vários órgãos da planta tende a diminuir pela seguinte ordem: raízes>folhas>caules>inflorescências>sementes. No entanto, esta ordem pode variar conforme a espécie (Sharma e Dubey, 2005).

Quando o Pb entra na raiz move-se maioritariamente via apoplasto, seguindo o fluxo da água até alcançar e se acumular na endoderme. Na superfície das raízes, a restrição na absorção de Pb para dentro das raízes baseia-se na ligação de Pb aos locais de troca iónica na parede celular e/ou à sua precipitação na forma carbonatada que se deposita nas paredes celulares (Pourrut et al., 2011).



Existem várias razões para que o transporte do Pb das raízes para a parte aérea seja limitado, nomeadamente a sua imobilização nas paredes celulares (Kopittke et al., 2007), precipitação de sais de Pb pouco solúveis nos espaços intercelulares (Małacka et al., 2009), acumulação nas membranas plasmáticas (Islam et al., 2007) ou sequestração nos vacúolos das raízes (Seregin et al., 2004). Contudo, nenhuma destas razões, só por si são suficientes para explicar a baixa taxa de translocação do Pb para a parte superior da planta. Na verdade, quando o Pb entra via apoplasto a sua entrada é bloqueada pela endoderme, que tem uma importante função de barreira física parcial, e apenas uma pequena fração de Pb se move através dos tecidos vasculares e se difunde para outros órgãos da planta (via simplasto). Nas células da endoderme, a maior parte do Pb é sequestrado ou excretado pelos sistemas de destoxificação. Assim, a distribuição de Pb nas raízes difere consoante as concentrações de Pb que a planta está sujeita. Em baixas concentrações, os iões de Pb movem-se no apoplasto, enquanto em elevadas concentrações, o efeito barreira é danificado e uma grande quantidade de Pb entra para dentro das células (Sharma e Dubey, 2005).

O transporte de Pb para a parte aérea é realizado via vascular (Krzesłowska et al., 2010), através do xilema onde forma complexos com aminoácidos e ácidos orgânicos (Maestri et al., 2010). No entanto, o Pb também pode ser transferido na sua forma inorgânica, tal como o Cd.

Apesar da absorção de Pb não ser seletiva depende, tal como todos os outros elementos, da bomba  $H^+$ /ATPase para manter a membrana potencial negativa nas células radiculares. O Pb tem de atravessar a membrana plasmática radicular, sendo um possível transporte através dos canais catiónicos, como os canais de  $Ca^{2+}$  e através dos transportadores HMAs (Clemens, 2006). A inibição da absorção de Pb pelo Ca (Kim et al., 2002) está associada à competição destes dois elementos pelos canais de Ca. Estes canais são a via principal de entrada de Pb nas raízes (Pourrut et al., 2008).

Os efeitos visuais não específicos da toxicidade com Pb são: uma rápida inibição do crescimento da raiz, um crescimento atrofiado da planta e o aparecimento de cloroses. Quando o Pb entra na célula, até uma pequena quantidade tem a particularidade de provocar uma grande variedade de efeitos adversos nos processos fisiológicos. A fitotoxicidade de Pb leva ao desequilíbrio mineral, ao desequilíbrio hídrico, alteração da permeabilidade da membrana, alterações na estrutura dos cloroplastos, inibição do crescimento da folha/raiz e da fotossíntese, bem como à indução de danos nas membranas das células (Cenkci et al., 2010; Gupta et al., 2011; Liu et al., 2009; Xiong et al., 2006).



As raízes das plantas rapidamente respondem à absorção de Pb através da diminuição do seu crescimento e alterações na morfologia das raízes. Em baixas concentrações há uma diminuição do desenvolvimento de extensão da raiz principal que é muito mais afetada que as raízes laterais. Com o aumento da concentração de Pb presente existe uma forte inibição do crescimento da raiz primária e uma zona muito mais pequena de ramificações laterais que são mais compactas e próximas da extremidade da raiz. A inibição do crescimento da raiz deve-se à inibição da divisão celular nos ápices radiculares (Eun et al., 2000).

#### 4.2.3.4. Cobre

No desenvolvimento normal de uma planta, o Cu deve ser absorvido pelas raízes, transportado e distribuído pela planta nos seus diferentes tecidos. Vários estudos indicam que o Cu se acumula preferencialmente nas raízes e apresenta uma baixa translocação para a parte aérea (Alaoui-Sosse et al., 2004; Assareh et al., 2008). Por este motivo, os sintomas precoces de toxicidade de Cu incluem a dificuldade no crescimento e no alongamento da raiz, antes de afetar a parte aérea. A toxicidade induzida pela presença de Cu tem um efeito significativo no crescimento e na morfologia da raiz, tais como uma raiz primária mais grossa, raízes com menores dimensões, com uma coloração acastanhada (necróticas) e que têm predisposição para serem atacadas por fungos (Reichman, 2002).

A entrada de Cu nas plantas, a sua armazenagem e consequente distribuição nas diferentes partes foi descrito, em pormenor, por Burkhead et al. (2009), Pilon (2011) e Pinto et al. (2014). Após ser absorvido pela raiz, para ser transportado para os vacúolos, o Cu liga-se a moléculas orgânicas ou forma quelatos, que também participam no transporte de metais essenciais, como Fe, Mn, Ni ou Zn. As plantas apresentam múltiplos transportadores para os vários elementos metálicos e, no caso, do Cu verifica-se que várias famílias de transportadores de elementos metálicos estão envolvidas no transporte e controlo da homeostase de Cu nas plantas: COPT, ATPases, ZIP, NRAMP e YSL (Colangelo e Guerinot, 2006; Hall, 2002; Kramer et al., 2007; Yruela, 2009). A quantidade de cada transportador varia com o tipo de tecido e as condições ambientais, tornando o processo de absorção e o movimento de nutrientes nas plantas muito complexos (Cailliatte et al., 2010; Vert et al., 2009).

O Cu em excesso afeta processos celulares importantes como a fotossíntese, substituição do ião Mg na molécula de clorofila, síntese de pigmentos, permeabilidade da membrana plasmática e outros mecanismos metabólicos, causando uma forte inibição do desenvolvimento da planta a nível foliar (Kupper et al., 2003; Yruela, 2005), causando sintomas como cloroses, necroses, crescimento atrofiado e inibição do crescimento da parte



aérea. Em casos de toxicidade mais grave, as folhas podem ficar murchas antes de se tornarem necróticas. A toxicidade com Cu também pode estar associada com o aparecimento de uma cor avermelhada nas folhas (Reichman, 2002; Yruela, 2009).

#### 4.2.3.5. Níquel

O Ni apresenta elevada mobilidade e, em elevadas concentrações pode rapidamente mover-se através do xilema e floema podendo assim, deslocar-se das raízes até à parte superior das plantas (Ishtiaq e Mahmood, 2011). Esta facilidade em ser translocado para a parte aérea deve-se à forma como o Ni é distribuído dentro do tecido radicular, que difere de outros EPTs como o Pb ou Cd, e assim consegue passar através da barreira da endoderme (Seregin e Kozhevnikova, 2006).

A entrada de Ni nas plantas, a sua sequestração e consequente distribuição nas células foi referido por Hall e Williams (2003) e Haydon e Cobbett (2007). A absorção de Ni nas plantas é realizada maioritariamente através do sistema radicular por difusão passiva ou transporte ativo (Seregin e Kozhevnikova, 2006). A razão entre estes dois processos varia com a espécie da planta e a sua concentração no meio de crescimento (Vogel-Mikus et al., 2005).

Quando é absorvido pela raiz, o Ni em excesso compete com vários catiões pelos mesmos transportadores, em particular, com o Fe e Zn, evitando que estes sejam absorvidos pelas plantas, o que pode originar deficiências nestes elementos essenciais e resultar em cloroses nas plantas (Khan e Khan, 2010; Sharma et al., 2008). A absorção e translocação de Ni, da raiz para a parte aérea, é inibida pela presença de outros elementos (Yusuf et al., 2011).

A nível radicular, a toxicidade provocada pela presença de Ni pode resultar na inibição do desenvolvimento da raiz e formação de raízes laterais (Alam et al., 2007; Gajewska et al., 2006). Para além disso, a acumulação de Ni nas raízes dificulta a divisão celular neste órgão, o que resulta na diminuição do seu crescimento.

A nível foliar, a toxicidade induzida por Ni causa diminuição da síntese de clorofila (Boisvert et al., 2007; Sharma et al., 2008) e inibição da fotossíntese (Chen et al., 2009). O Ni também compete com o Mg e substitui-o na molécula de clorofila e em enzimas como a Rubisco (Yusuf et al., 2011). A sua presença também provoca o desequilíbrio no balanço hídrico através da redução da taxa de transpiração e leva ao fecho dos estomas (Chen et al., 2009). Os efeitos tóxicos do Ni incluem cloroses, necroses, inibição do crescimento da parte aérea e diminuição da área foliar (Shaw et al., 2004).





#### 4.2.3.6. Zinco

As raízes das plantas absorvem o Zn predominantemente como íon divalente e o metal essencial é distribuído por toda a planta. A homeostase de Zn nas células é um processo complexo. Segundo Pilon et al. (2009), várias famílias de transportadores de metais têm sido identificados como estando envolvidos no transporte de Zn através das membranas: ZIP (Wintz et al., 2003), CDF (Kim et al., 2004), HMAs (Mills et al., 2005) e YSL (Pinto et al., 2014). A função destes transportadores na absorção de Zn, efluxo e influxo, distribuição, armazenamento e destoxificação nas células tem sido caracterizada por vários autores (Kramer et al., 2007; Lin e Aarts, 2012; Pinto et al., 2014). Após a absorção de Zn, este pode ser transportado no xilema, onde é quelatado com diferentes moléculas, incluindo ácidos orgânicos, como o citrato e malato, His, MT e NA (Broadley et al., 2007; Haydon e Cobbett, 2007), sendo posteriormente a maior parte armazenada nos vacúolos.

O Zn, presente em elevadas concentrações, pode ser tóxico e as plantas afetadas podem evidenciar sintomas semelhantes aos observados com outros EPTs, como o Cd ou Pb (Sagardoy et al., 2009). Nas raízes, a presença de Zn provoca o amarelecimento, a diminuição do crescimento da raiz principal e o aparecimento de raízes laterais menores (Reichman, 2002).

Os sintomas iniciais do excesso de Zn incluem cloroses visíveis nas folhas jovens devido à deficiência induzida em Mg ou Fe, e resultante da substituição de Zn na molécula de clorofila (Reichman, 2002; Sagardoy et al., 2009; Sivasankar et al., 2012). A presença em excesso de Zn pode facilmente substituir outros íons metálicos semelhantes em sítios ativos de enzimas ou de transportadores (Fukao et al., 2011). Em concentrações mais elevadas, o Zn também induz síntese de antocianinas e, portanto, vermelhidão de folhas provavelmente devido à deficiência em P (Fontes e Cox, 1995; Reichman, 2002; Yadav, 2010). Há também o aparecimento de pontos necróticos nas folhas e eventualmente, podem aparecer folhas mortas. Os parâmetros de crescimento são negativamente afetados pela toxicidade com Zn, tais como inibição do crescimento e rendimento da planta, a diminuição no comprimento das raízes e parte aérea, assim como a área das folhas (Broadley et al., 2007; Vijayarengan e Mahalakshmi, 2013).



### 4.3. Material e métodos

Para a avaliação e caracterização da acumulação de EPT, em alface, foi realizado um ensaio em solução nutritiva<sup>1</sup>. Para este efeito foi determinada a concentração de cada EPT nas diferentes partes da planta e foram ajustados modelos matemáticos adequados para relacionar essa acumulação com o EPT no meio contaminado. Os pressupostos para a utilização dos modelos utilizados serão definidos em 4.3.5.2.

#### 4.3.1. Material Vegetal

Neste ensaio foram utilizadas duas cultivares de alface (**Figura 4.7**), tal como no **Capítulo III**.



**Figura 4.7** – As duas cultivares de alface utilizadas neste ensaio com cultura sem solo. A-Alface DP; B-Alface M4E.

#### 4.3.2. Delineamento experimental

A metodologia utilizada nestes ensaios baseou-se na descrição de Stritsis e Claassen (2013). Os ensaios foram realizados em 4 fases: uma 1ª fase de sementeira, germinação e crescimento das plântulas, em vermiculite, até à transplantação para meio líquido, com duração de 16 dias (aparecimento de 2 a 3 folhas); uma 2ª fase intermédia que se inicia com a transplantação e permanência, durante 21 dias, em solução nutritiva de Hoagland; uma 3ª fase que se inicia com a contaminação do meio líquido e crescimento durante 37 dias; e uma 4ª fase que consistiu em cinco colheitas realizadas ao fim de 39, 43, 50, 57 e 64 dias de crescimento vegetativo (ou seja, 2, 6, 13, 20 e 27 dias após contaminação). Cada ensaio teve a duração total de aproximadamente 2 meses e realizou-se em tabuleiros com 6 L de solução (**Figura 4.8**).

<sup>1</sup> Neste estudo, utilizaremos o termo hidroponia, como designação genérica para “cultura sem solo” ou “em solução nutritiva”.



A contaminação das plantas de alface ocorreu quando estas apresentaram um desenvolvimento vegetativo adequado à contaminação, ou seja, após o aparecimento de 4 a 5 folhas (planta jovem). A contaminação da solução nutritiva foi feita com 5 concentrações diferentes, estando as concentrações utilizadas descritas na **Tabela 4.1**.

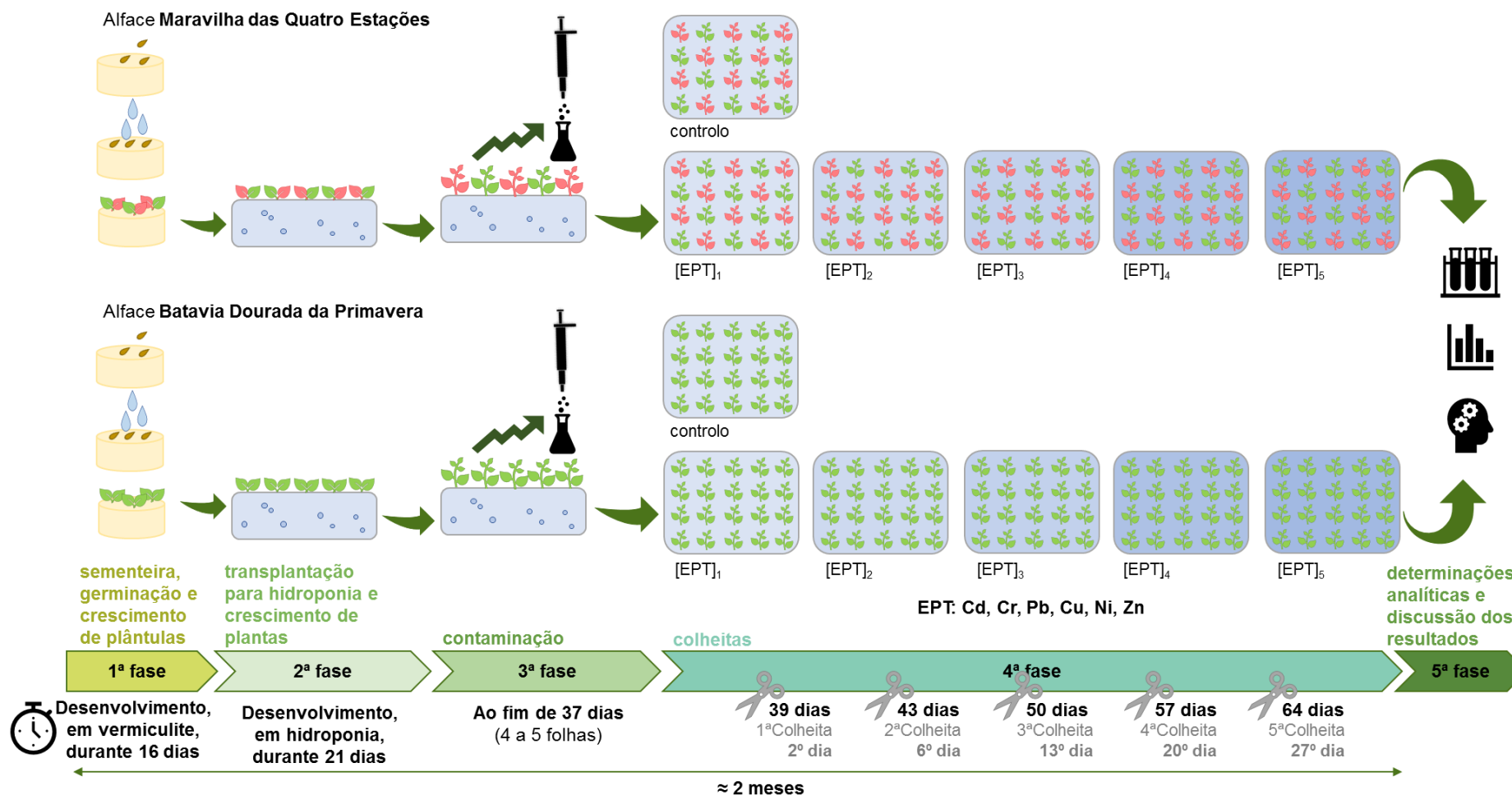
**Tabela 4.1** – Concentrações de EPT aplicadas, para cada modalidade, no ensaio de avaliação da acumulação de ETPs com cultura sem solo.

EPT	Controlo	[EPT] <sub>1</sub>	[EPT] <sub>2</sub>	[EPT] <sub>3</sub>	[EPT] <sub>4</sub>	[EPT] <sub>5</sub>
	(μM)					
não essenciais						
Cd	0	5	10	15	25	50
Cr	0	50	75	100	125	150
Pb	0	50	75	100	125	150
essenciais						
Cu	0	10	15	25	35	50
Ni	0	50	100	125	150	200
Zn	0	50	100	125	150	200

Para cada cultivar, aplicaram-se os seguintes EPTs: Cd, Cr, Pb, Cu, Ni ou Zn. Neste ensaio optou-se por excluir a contaminação com Mn, uma vez que a alface demonstrou ser bastante tolerante à sua presença, de acordo com o verificado nos resultados obtidos no **Capítulo III**. As concentrações foram escolhidas tendo por base os resultados obtidos no **Capítulo III**, e o facto de um EPT ser considerado essencial ou não essencial foi também considerado.

A contaminação foi realizada com a preparação de uma solução *stock* (0,1 M), com cada um dos sais descritos em **2.1.2.**, para se obter a concentração pretendida para cada modalidade. As soluções de contaminação foram aplicadas às plantas através de contaminação da solução nutritiva de Hoagland utilizada.

As soluções que constituíram o meio líquido foram substituídas semanalmente, de forma a garantir que as plantas se desenvolviam nas concentrações pretendidas (Stritsis e Claassen, 2013).



**Figura 4.8** – Representação esquemática do ensaio de avaliação da acumulação de EPTs.



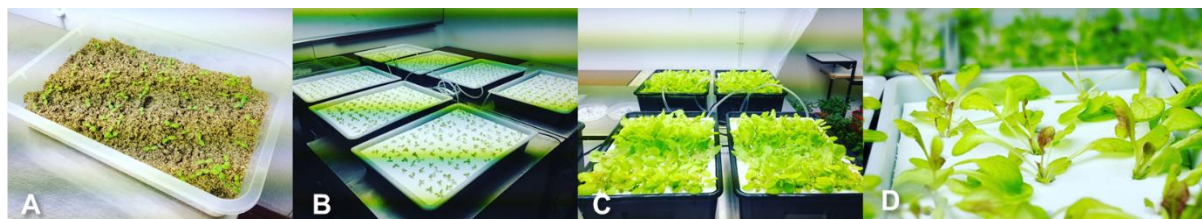
No que diz respeito ao ensaio com Ni, realizou-se um primeiro ensaio com a aplicação de 10, 15, 25, 35 e 50  $\mu\text{M}$  com base no ensaio de germinação e crescimento de plântulas contaminadas com este EPT. Nestas condições, a alface manifestou alguma sensibilidade, mas não foram obtidas diferenças visuais de toxicidade, em relação ao controlo, pelo que para o Ni foi realizado um ensaio com concentrações mais elevadas, tal como descrito na **Tabela 4.1**. Este ensaio foi útil também para a definição das concentrações aplicadas de Zn que sendo também um micronutriente essencial é expectável um comportamento semelhante.

Para o delineamento do ensaio prévio com Cr foi utilizado  $\text{FeCl}_3$  em substituição do  $\text{FeNaEDTA}$  (Gardea-Torresdey et al. 2004, Shanker and Pathmanabhan 2004., Zeng et al. 2014). Estes autores sugerem a utilização de uma solução nutritiva de Hoagland modificada, ou seja, com a adição de outros compostos de ferro ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$ ) em vez do  $\text{FeNaEDTA}$  devido à sua interferência com a especiação do Cr.

No ensaio de contaminação com Pb foi utilizada uma solução nutritiva de Hoagland modificada que consistiu na substituição do  $\text{FeNaEDTA}$  pelo  $\text{FeCl}_3$ , para evitar a complexação deste elemento com o EDTA, de acordo com o que é referido por (Mohtadi et al., 2013; Tanhan et al., 2007).

#### 4.3.3. Instalação dos ensaios

Os ensaios realizaram-se, no Horto de Química Agrícola, numa sala com temperatura, humidade e intensidade luminosa controladas (**Figura 4.9**), com as condições de crescimento e metodologia da produção inicial de plantas descritas em 2.1.2. e 2.1.3. (**Capítulo II**).



**Figura 4.9** – Registo fotográfico dos ensaios instalados, na sala de crescimento, no Horto de Química Agrícola. A-desenvolvimento de plântulas ao fim de 16 dias em vermiculite; B-crescimento de plantas em hidroponia; C-plantas ao fim de 21 dias de crescimento (contaminação); D-plantas após 2 dias de contaminação.

Os ensaios para avaliação da acumulação de EPTs decorreram entre 2014 e 2015. Na **Tabela 4.2** é apresentado o cronograma para este ensaio.

**Tabela 4.2** – Cronograma dos ensaios realizados para a avaliação da acumulação de EPTs.

Ano	Mês											
2014	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
									Cd			
											Cu	
												Ni
2015	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
	Cu											
	Ni											
		Ni										
		Zn										
				Cr								
				Pb								

Legenda:



Cd

Cu

Ni [mais baixas]

Cr (ensaio prévio)

Determinações analíticas



Pb

Cr

Ni [mais elevadas]

Zn

O delineamento experimental foi definido a partir de ensaios prévios, realizados nas mesmas condições e com os mesmos materiais vegetais, com controlo e diferentes concentrações de um EPT (Cr), para definição dos tempos de exposição adequados (planta jovem e adulta) para se efetuar a contaminação das plantas.

#### 4.3.4. Colheita, amostragem e conservação de amostras

Na amostragem do material vegetal retiraram-se 3 a 4 plantas de forma aleatória para cada modalidade (amostra controlo e contaminadas). As colheitas foram realizadas 2, 6, 13, 20 e 27 dias após a contaminação. Na colheita foram constituídas amostras separadas de parte aérea e de raiz, que foram pesadas, obtendo-se a respetiva massa fresca (MF). Fez-se também um registo fotográfico dos efeitos visíveis de toxicidade.

Todo o material vegetal foi seco e conservado nas condições descritas em 2.2.1., obtendo-se posteriormente a massa seca (MS).



#### 4.3.5. Determinações analíticas

Neste ensaio analisaram-se os sintomas visíveis de toxicidade, determinou-se a biomassa da parte aérea e da raiz e o conteúdo de cada EPT para a caracterização da acumulação na parte aérea e na raiz das plantas.

##### 4.3.5.1. Determinação da concentração de elementos químicos

Procedeu-se à realização de uma digestão ácida, com o material vegetal seco obtido, como descrito em 2.3.1.1., e posterior leitura dos extratos por EAAC ou EAAE, conforme a quantidade de elemento químico presente na amostra (2.3.1.2.). As condições experimentais utilizadas encontram-se descritas no **Anexo A** (nas **Tabelas A1 e A2**).

##### 4.3.5.2. Acumulação de EPT

Para se caracterizar a acumulação nas plantas de alface ajustaram-se os modelos matemáticos que melhor explicam o comportamento de determinado EPT na planta, em função da concentração presente em solução nutritiva. Os modelos considerados foram os seguintes:

(i) modelo linear:

$$c = mc_{EPT} + b$$

em que:

$c$  é a concentração de EPT na planta,  $\text{mg kg}^{-1}$  MS.

$c_{EPT}$  é a concentração de EPT na solução nutritiva,  $\mu\text{M}$ .

(ii) modelo polinomial:

$$c = ac_{EPT}^2 + bc_{EPT} + c$$

em que:

$c$  é a concentração de EPT na planta,  $\text{mg kg}^{-1}$  MS.

$c_{EPT}$  é a concentração de EPT na solução nutritiva,  $\mu\text{M}$ .





(iii) modelo hiperbólico: ajuste a uma curva hiperbólica análoga à equação de Michaelis-Menten:

$$c = \frac{c_{\text{máx}} \times c_{\text{EPT}}}{K_{\text{EPT}} + c_{\text{EPT}}} \times 100$$

em que:

$c$  é a concentração de EPT na planta,  $\text{mg kg}^{-1}$  MS.

$c_{\text{máx}}$  é a concentração máxima de EPT na planta,  $\text{mg kg}^{-1}$  MS.

$c_{\text{EPT}}$  é a concentração de EPT na solução nutritiva,  $\mu\text{M}$ .

$K_{\text{EPT}}$  é o coeficiente de acumulação para o EPT, ou seja, indica a concentração para a qual se atinge metade do valor de concentração máxima do EPT na planta (por analogia com a definição do parâmetro  $K_m$  da equação de Michaelis-Menten).

Este ajuste foi feito com o *software* disponível online em [www.mycurvefit.com](http://www.mycurvefit.com).

#### 4.3.5.3. Índices para avaliação da toxicidade dos EPTs estudados

O cálculo dos valores relativos à humidade (H) foi realizado tendo por base a seguinte equação:

$$H = \frac{MF - MS}{MF} \times 100 (\%)$$

em que:

MF é a massa fresca da parte aérea ou raiz, g.

MS é a massa seca da parte aérea ou raiz, g.

O índice de tolerância (IT) foi calculado com base no descrito por Seregin e Kozhevnikova (2006):

$$IT = \frac{MF_{\text{EPT}}}{MF_{\text{CT}}} \times 100 (\%)$$



em que:

$MF_{CT}$  é a massa fresca, da parte aérea ou raiz, de plantas controle, g.

$MF_{EPT}$  é a massa fresca, da parte aérea ou raiz, de plantas contaminadas com EPT, g.

A concentração de metal que inibe em 50 % o crescimento da raiz ( $LC_{50}$ ) (Seregin e Kozhevnikova, 2006) foi calculado conforme a seguinte equação, cujo significado dos parâmetros já foram descritos anteriormente:

$$LC_{50} = \frac{MF_{CT} - MF_{EPT}}{MF_{CT}} \times 100 (\%)$$

Esta equação também foi utilizada no cálculo da diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz de plantas contaminadas, relativamente às plantas controle.

A proporção de EPT nas folhas em relação à quantidade presente na raiz considerada como 100 %, ou seja, dá uma indicação do valor percentual de EPT translocado para a parte aérea (T), é obtida através da seguinte expressão:

$$T = \frac{[EPT]_F}{[EPT]_R} \times 100 (\%)$$

em que:

$[EPT]_F$  é a concentração de EPT em folha de plantas contaminadas,  $mg\ kg^{-1}\ MS$ .

$[EPT]_R$  é a concentração de EPT em raiz de plantas contaminadas,  $mg\ kg^{-1}\ MS$ .

#### 4.3.6. Tratamento estatístico

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente no programa SPSS 13.0 (SPSS Inc.). A análise estatística aplicada nestes resultados foi uma análise de variância (ANOVA) a um fator, que permitiu avaliar o efeito do fator concentração de EPT aplicado, ao longo do tempo, na MF da parte aérea e da raiz e na acumulação de EPT. Para se determinar se existiam diferenças significativas entre as médias, das amostras controle e contaminadas, utilizou-se o teste Tukey, com um nível de confiança de 95 %.

As letras minúsculas nos gráficos refletiram se existiam diferenças significativas entre as médias de cada modalidade, ou seja, se para o controle existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) ao longo de 2, 6, 13, 20 ou 27 dias. Os asteriscos (\*) indicaram diferenças significativas



( $p < 0,05$ ) entre a amostra controle e as contaminadas, ou seja, se, por exemplo, ao fim de 20 dias existem diferenças significativas das diferentes modalidades em relação ao controle.

A análise de partição por *clusters* (Partition Cluster Analysis, PAM) foi realizada usando o programa R 1.0.136 (RStudio, Inc.). A PAM foi realizada definindo-se, à priori, a formação de 3 *clusters*, permitindo distribuir por classes e diferenciar os indivíduos contaminados com cada EPT.

Este tratamento estatístico foi efetuado para os indivíduos das duas cultivares de alface, expostos às diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni e Zn, ao fim de 2 e 27 dias de contaminação. Utilizou-se uma matriz de correlação dos dados com 3 variáveis normalizadas: quantidade acumulada de elemento químico contaminante ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS), massa fresca da parte aérea (g) e massa fresca da raiz (g).

#### 4.4. Resultados e Discussão

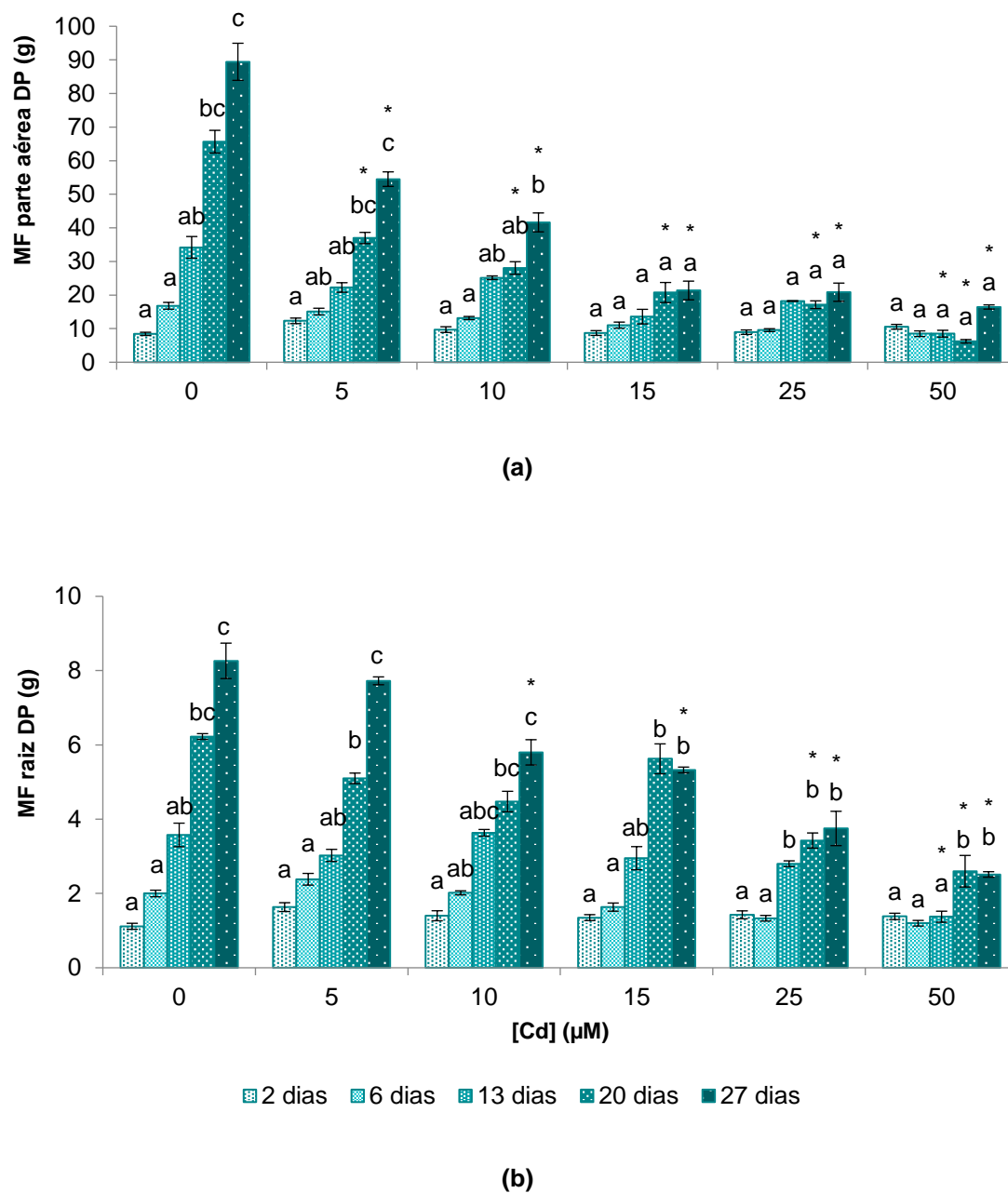
Vários autores têm descrito o efeito de EPTs no crescimento e aspeto exterior das plantas, bem como a sua acumulação (Cheng e Allen, 2001; Espinoza-Quiñones et al., 2009; He et al., 2014; Stritsis e Claassen, 2013). Com este ensaio pretende-se caracterizar a acumulação de Cd, Cu, Cr, Pb, Ni ou Zn nas duas cultivares de alface, assim como avaliar como estes EPTs afetam a massa fresca da parte aérea e da raiz e se existem sintomas visíveis de toxicidade.

##### 4.4.1. Cádmio

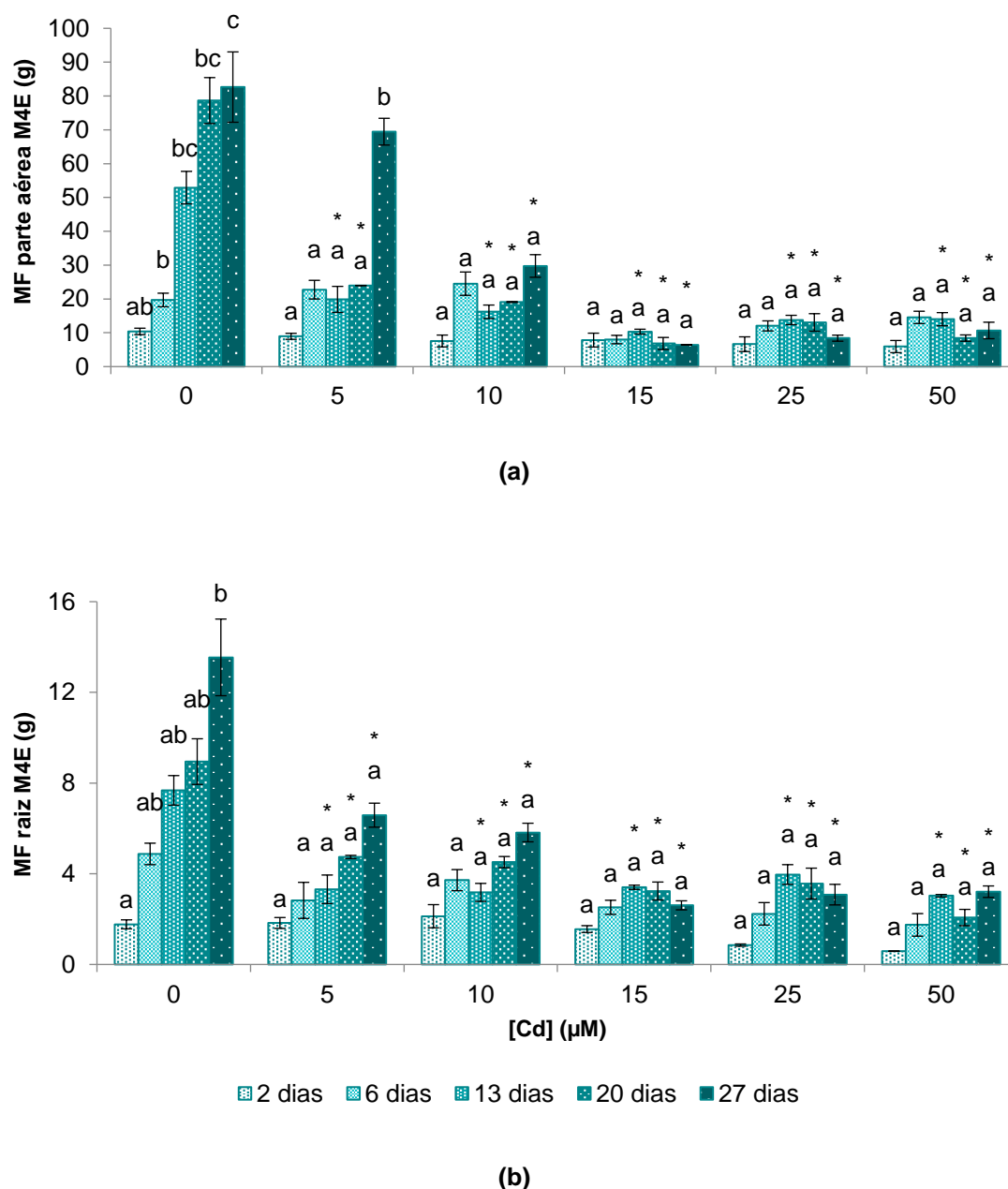
##### 4.4.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Cd

Nas **Figuras 4.10 e 4.11** encontram-se os resultados obtidos para a massa fresca da parte aérea e da raiz, para a alface DP e M4E, respetivamente. Os sintomas visíveis de toxicidade observados para cada cultivar apresentam-se na **Figura 4.12**.

Em ambas as cultivares de alface é notória uma diminuição da massa fresca tanto da parte aérea como da raiz com o aumento da concentração de Cd aplicado em solução nutritiva, evidenciando o efeito tóxico do Cd nas plantas de alface.

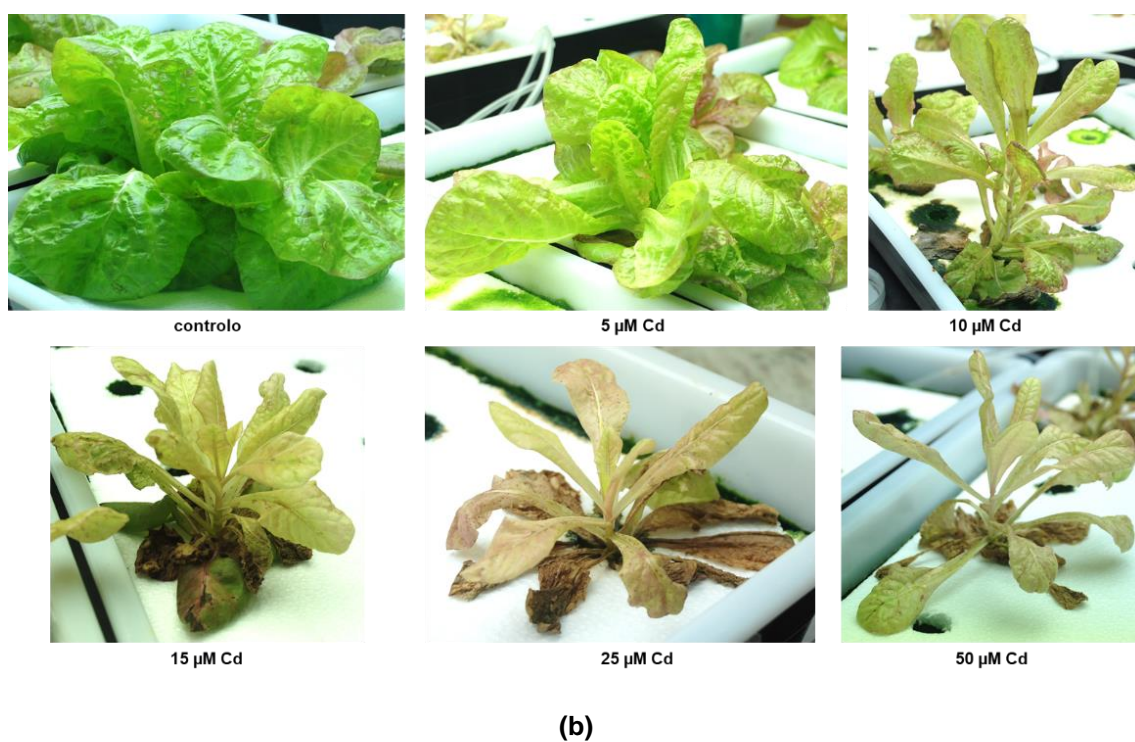
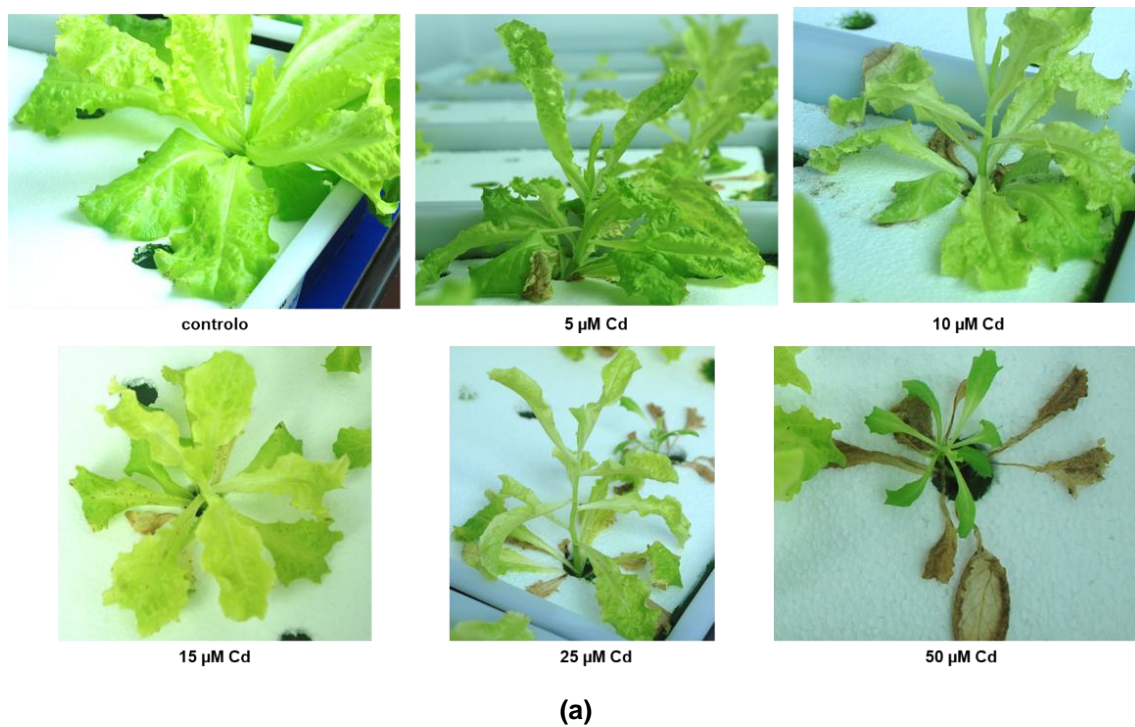


**Figura 4.10** – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 5, 10, 15, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de Cd. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada modalidade. O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 4.11** – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 5, 10, 15, 25 e 50 µM de Cd.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada modalidade. O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 4.12** – Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface DP (a) e M4E (b) expostas a Cd durante 27 dias.





Como seria de esperar, verifica-se que a massa fresca das plantas controlo aumenta ao longo do tempo o que reflete o crescimento normal da planta. Em plantas contaminadas com Cd esse crescimento é afetado.

Na alface DP existe uma diminuição significativa, comparativamente ao controlo, na massa fresca da parte aérea ao fim de 20 e 27 dias de exposição para todas as concentrações de Cd presentes em solução nutritiva, bem como plantas expostas durante 13 dias com 50  $\mu\text{M}$  de Cd (**Figura 4.10-a**). Na raiz, observam-se diferenças significativas, em relação ao controlo, ao fim de 27 dias (10, 15, 25 e 50  $\mu\text{M}$ ), 20 dias (25 e 50  $\mu\text{M}$ ) e 13 dias (50  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 4.10-b**).

Na alface M4E, há uma diminuição muito significativa na massa fresca da parte aérea de plantas expostas a 10, 15, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de Cd ao fim de 27 dias de exposição. Ao fim de 13 e 20 dias, existe uma redução significativa para todas as concentrações de Cd presentes em solução nutritiva (**Figura 4.11-a**). Na raiz, a exposição durante 13, 20 e 27 dias a todas as concentrações de Cd presentes no meio contaminado, reflete-se em diferenças significativas comparativamente ao controlo (**Figura 4.11-b**).

Através da observação dos gráficos é possível verificar que é a parte aérea que é mais afetada em termos de biomassa nas duas cultivares. Se se considerar a exposição ao fim de 27 dias com concentração mais elevada de 50  $\mu\text{M}$  Cd, e calculando-se os valores relativos à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controlo, é possível confirmar este efeito. No caso da alface DP existe uma diminuição de 81,6 % na parte aérea, e de 69,6 % na raiz. Na alface M4E, verifica-se o mesmo comportamento, com uma diminuição de 87,1 % e de 76,3 %, para a parte aérea e raiz, respetivamente.

Outros autores também têm observado que a presença de Cd no meio leva à diminuição do crescimento radicular, bem como foliar. Por exemplo, em alface, o crescimento da parte aérea foi bastante inibido quando as plantas foram expostas durante 7 dias a 100  $\mu\text{M}$  de Cd (Monteiro et al., 2009). Michalska e Asp (2001) também verificaram que a biomassa da parte aérea e da raiz diminui na presença de uma concentração relativamente baixa de Cd (0,5  $\mu\text{M}$ ) em 3 cultivares de alface (Roxette, Oresto e Pia). A mesma tendência foi obtida por Zorrig et al. (2010) num estudo realizado também com 3 cultivares de alface (*Paris Island Cos*, *Korlaat* e *Red Salad Bowl*) expostas durante 8 dias a 15, 25, 35 e 50  $\mu\text{M}$ .

Resultados semelhantes foram obtidos por diversos autores com outras plantas. Nouairi et al. (2006) verificaram que o Cd provocou a diminuição do crescimento da parte aérea e da raiz, em plantas de *Brassica juncea* e *Brassica napus*, expostas durante 15 dias a 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  de Cd. Stritsis e Claassen (2013) referiram que a presença de 1,0  $\mu\text{M}$  de Cd levou à





diminuição da biomassa em milho, espinafre, linhaça e girassol. Ghnaya et al. (2005) observaram que concentrações de Cd entre 50 e 300  $\mu\text{M}$ , em solução nutritiva, diminuíram significativamente o crescimento de plantas de *M. crystallinum*. Em plantas de girassol, um excesso de Cd causou um crescimento lento e uma diminuição da biomassa, sendo as raízes o primeiro local de exposição à toxicidade do metal e, por isso, mais severamente afetadas (Gopal e Nautiyal, 2011), ao contrário do que aconteceu com as plantas de alface em que a parte aérea demonstrou ser a mais afetada.

Vários estudos com metais pesados demonstraram uma diminuição no teor de água em plantas contaminadas com Cd, tendo como consequência uma diminuição na biomassa, e referem que o efeito tóxico do Cd pode ser causado, indiretamente, por uma redução na absorção de água (Ali et al., 2015; Martins et al., 2013). No presente trabalho foram calculados os valores médios das percentagens de humidade para a biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controlo, considerando-se a exposição ao fim de 27 dias com 50  $\mu\text{M}$  de Cd. Na alface DP verifica-se que existe uma ligeira diminuição no teor de água das plantas controlo (parte aérea: 92,0 %; raiz: 92,7 %) em relação às plantas contaminadas (parte aérea e raiz: 90,3 %). Na alface M4E observa-se que também há tendência para a redução no teor de água das plantas controlo (parte aérea: 85,3 %; raiz: 86,5 %) em relação às plantas contaminadas (parte aérea: 83,9 % e raiz: 85,5 %). Esta diminuição aparentemente não parece significativa e muito provavelmente o Cd estará a interferir com outro elemento que é essencial para o normal desenvolvimento da planta (Sun et al., 2017).

Para ambas as cultivares é evidente o efeito tóxico do Cd, nomeadamente uma diminuição do tamanho da folha, o aparecimento de folhas jovens cloróticas e com cor ligeiramente avermelhada (no caso, da alface M4E) e de necroses nas folhas adultas (**Figuras 4.12**). As raízes das plantas controlo apresentam-se longas, fasciculadas e com coloração branca. Por outro lado, as raízes das plantas contaminadas, com o aumento da concentração de Cd em solução nutritiva, diminuem de tamanho, escurecem, aparecem ramificações laterais de menores dimensões e pontos negros nas extremidades das raízes. A alteração da morfologia da raiz pode estar relacionada com o crescimento anormal das células e o escurecimento deve-se à lenhificação (Martins et al., 2013).

A alface poderá ser uma boa bioindicadora da toxicidade do Cd, uma vez que manifesta claramente os seus efeitos adversos. Zorrig et al. (2010) sugeriram que a alface poderá ser um bom modelo para estudar os mecanismos responsáveis pela acumulação de Cd nos tecidos da planta, bem como desenvolver estratégias para diminuir esta acumulação nas partes edíveis. Monteiro et al. (2009) também referiram o aparecimento de sintomas visíveis



de toxicidade em plantas de alface expostas a 100  $\mu\text{M}$  de Cd, nomeadamente, cloroses e necroses nas folhas e o escurecimento das raízes. Sintomas visíveis semelhantes foram observados por Michalska e Asp (2001) em plantas de alface, nomeadamente, cloroses e uma diminuição do crescimento das folhas. Os autores verificaram que o Cd teve um efeito mais tóxico nas 3 cultivares de alface que o Pb, sendo isso mais evidente na diminuição da biomassa das folhas e raízes. Num outro estudo realizado por Zorrig et al. (2010) com 3 cultivares de alface sujeitas a 35 e 50  $\mu\text{M}$  de Cd, observaram-se cloroses nas folhas, ao contrário do que se verificou com a exposição a concentrações mais baixas (15 e 25  $\mu\text{M}$ ) onde a presença de cloroses foi menos acentuada. O aparecimento de folhas cloróticas e de necroses em plantas expostas a Cd também foi verificado em folhas de plantas halófitas (Ghnaya et al., 2005), girasol (Gopal e Nautiyal, 2011), tabaco (Martins et al., 2011), tomate (López-Millán et al., 2009), *Brassica juncea* (Ebbs e Uchil, 2008) e pepino (Sun et al., 2015). Baryl et al. (2001) referiram que estes sintomas se observaram maioritariamente nas primeiras folhas e apenas ocasionalmente, nas folhas recém-desenvolvidas, indicando que o Cd se acumula preferencialmente em folhas mais antigas o que protege as folhas mais jovens do seu efeito nocivo.

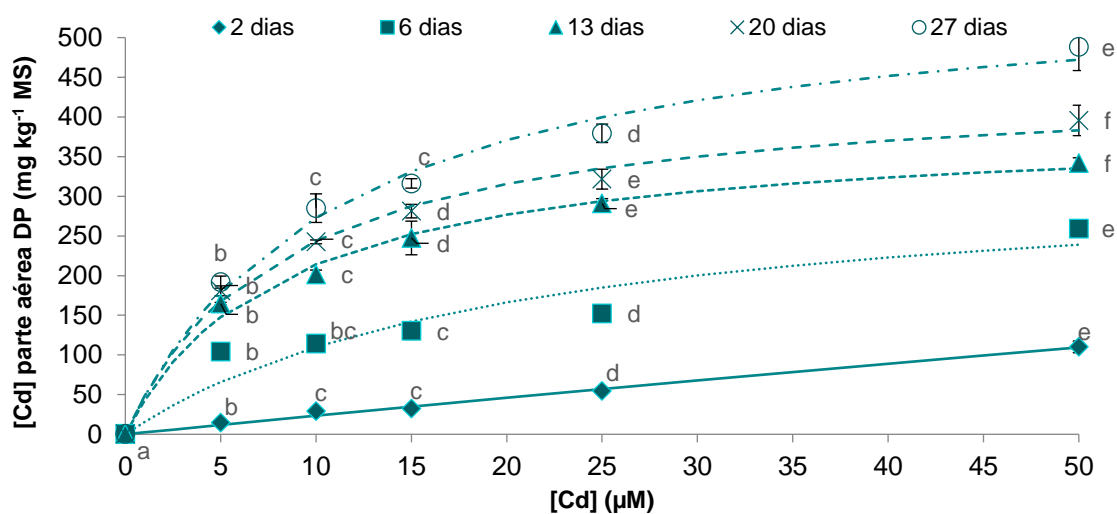
#### 4.4.1.2. Caracterização da acumulação de Cd

As concentrações de Cd acumuladas, em folha e raiz, em função da concentração de Cd presente na solução nutritiva estão representadas nas **Figuras 4.13 e 4.14** para a alface DP e nas **Figuras 4.15 e 4.16** para a alface M4E.

É possível verificar que à medida que se aumenta a concentração de Cd na solução nutritiva, a planta acumula uma maior quantidade deste elemento (Fernández et al., 2014; Martins et al., 2014; Pinto et al., 2017; Ramos et al., 2002).

A acumulação de Cd por estes dois órgãos apresenta um comportamento hiperbólico análogo às curvas de Michaelis-Menten, como referido em **4.3.5.2**. Este ajuste ao modelo hiperbólico também foi utilizado por Dandan et al. (2011) para as concentrações de Cd acumuladas em raízes de trigo. Estes ajustes estão representados pelas linhas das **Figuras 4.13-4.16**, assim como os parâmetros desse ajuste.

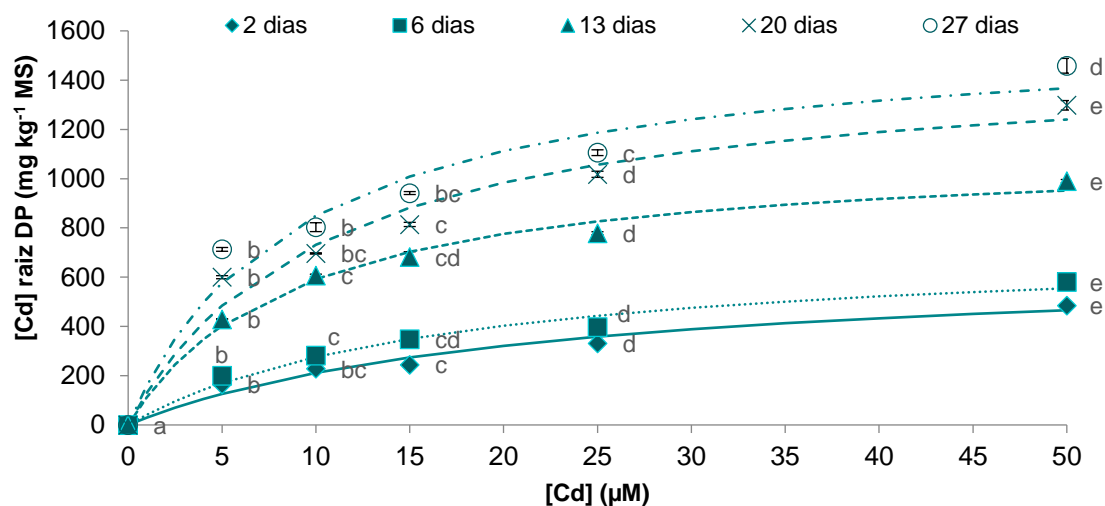
O  $C_{\text{máx}}$  aumenta à medida que as plantas são expostas durante mais tempo ao Cd, ou seja, quando existe um maior tempo de exposição a este elemento permite que exista uma maior acumulação do elemento. O  $K_{\text{Cd}}$  é um parâmetro que caracteriza o processo de acumulação de Cd e é dependente do valor de  $C_{\text{máx}}$  obtido em cada um dos tempos de exposição.



dias	$C_{\text{máx}}$	$K_{\text{Cd}}$	$R^2$	Linha
2	1371,6	576,1	0,9930	—
6	337,4	20,6	0,9109	.....
13	390,0	8,2	0,9927	----
20	446,5	8,3	0,9941	----
27	576,9	11,1	0,9915	-.-.-

**Figura 4.13** – Concentração de Cd na parte aérea de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 5, 10, 15, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de Cd.

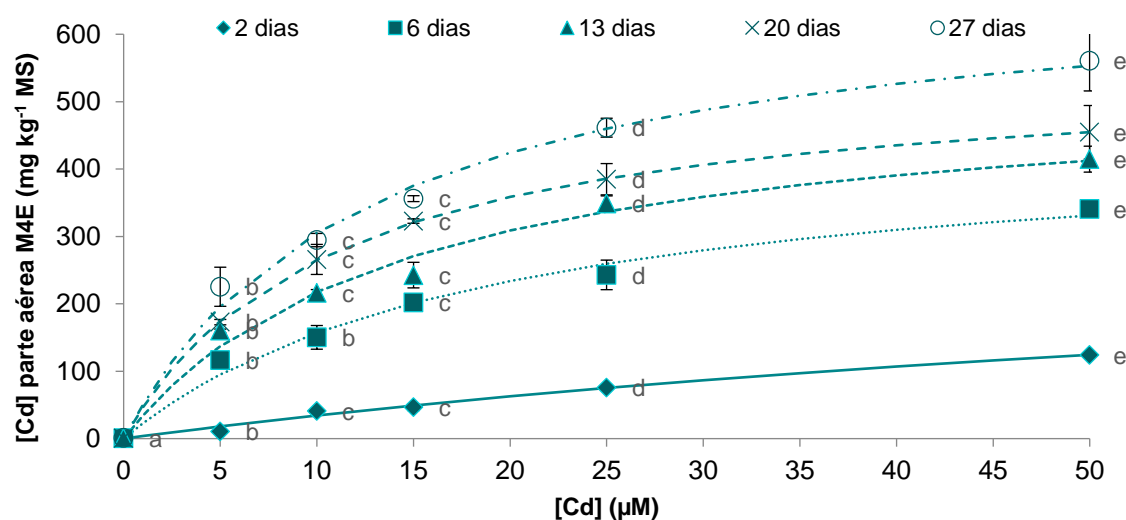
As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



dias	$C_{\text{máx}}$	$K_{\text{Cd}}$	$R^2$	Linha
2	665,8	21,5	0,9718	—
6	740,4	16,7	0,9807	.....
13	1121,3	8,9	0,9911	----
20	1500,5	10,5	0,9748	----
27	1612,8	9,0	0,9662	-.-.-

**Figura 4.14** – Concentração de Cd em raiz de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 5, 10, 15, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de Cd.

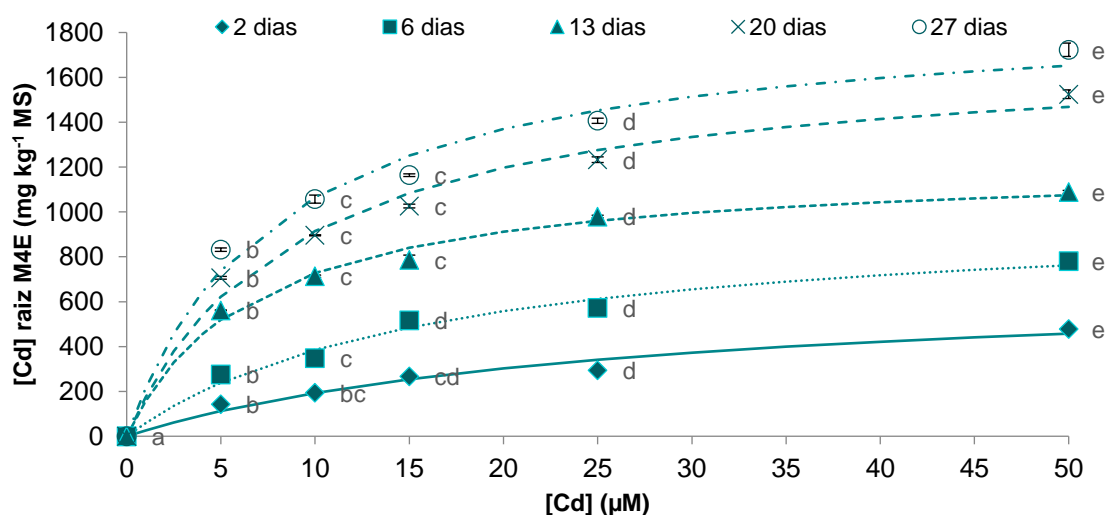
As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



dias	$C_{\text{máx}}$	$K_{\text{Cd}}$	$R^2$	Linha
2	363,6	96,2	0,9896	—
6	457,3	19,1	0,9869	.....
13	530,8	14,4	0,9860	----
20	553,5	10,9	0,9999	- - - -
27	693,7	12,7	0,9925	- . - .

**Figura 4.15** – Concentração de Cd na parte aérea de plantas de alface M4E ao fim ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 5, 10, 15, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de Cd.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



dias	$C_{\text{máx}}$	$K_{\text{Cd}}$	$R^2$	Linha
2	695,2	26,0	0,9712	—
6	1009,1	16,2	0,9845	.....
13	1219,9	6,8	0,9925	----
20	1730,3	8,9	0,9883	- - - -
27	1915,4	8,0	0,9865	- . - .

**Figura 4.16** – Concentração de Cd em raiz de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 5, 10, 15, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de Cd.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



Para todos os tempos de exposição verifica-se que o mecanismo de acumulação é semelhante e descrito pelo mesmo tipo de curva ajustada.

As curvas de acumulação indicam que à medida que a concentração de Cd no meio aumenta existe uma tendência para a estabilização de Cd na planta, o que pode resultar na possível saturação de transportadores e o estabelecimento de equilíbrios entre o interior da planta e o Cd presente na solução nutritiva (Gallego et al., 2012).

Apesar de a acumulação não atingir a saturação quando a quantidade de elemento se torna elevada no meio de crescimento, este modelo foi aplicado aos resultados uma vez que permite ter uma ideia dos parâmetros de fluxo do Cd, em ambos os órgãos da planta. Em solução nutritiva a disponibilidade de Cd é elevada e quase completa, pelo que se pode considerar adequada a utilização deste modelo. Nestas condições de ensaio, verifica-se que existe um ajuste razoável ao modelo hiperbólico, tal como indicam os valores de  $R^2 > 0,91$ .

A alface poderá ser considerada uma planta tolerante e não hiperacumuladora de Cd, de acordo com o descrito nas **Figuras 4.5 e 4.6**. De acordo com Prasad (2004) as plantas consideradas tolerantes e não hiperacumuladoras, ou também conhecidas por acumuladoras, acumulam quantidades elevadas de elemento até quando o elemento está em concentrações baixas na solução nutritiva e possuem certos mecanismos de destoxificação nos seus tecidos, que lhes permitem acumular elevadas quantidades de EPTs.

Relativamente às diferenças entre cultivares, os parâmetros obtidos indicam que as duas cultivares de alface demonstram ter o mesmo comportamento hiperbólico na acumulação de Cd, podendo evidenciar que a alface tem um comportamento compatível com uma planta acumuladora de cádmio.

As plantas de alface acumulam uma maior concentração de Cd nas raízes relativamente à parte aérea. Ao fim de 2 dias de exposição as raízes acumulam  $164,31 \pm 13,08$  mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  MS (DP) e  $142,92 \pm 23,46$  mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  MS (M4E) quando sujeitas a 5  $\mu\text{M}$  de Cd. As folhas acumulam  $14,53 \pm 0,39$  mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  MS (DP) e  $10,38 \pm 0,89$  mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  MS (M4E) quando sujeitas a 5  $\mu\text{M}$  de Cd. Na planta adulta, as raízes acumulam  $1458,37 \pm 132,36$  mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  MF (DP) e  $1723,15 \pm 100,84$  mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  MF (M4E), quando expostas durante 27 dias, a 50  $\mu\text{M}$  de Cd. As folhas acumulam  $488,32 \pm 28,89$  mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  MF (DP) e  $560,74 \pm 44,94$  mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  MF (M4E), quando expostas durante 27 dias, a 50  $\mu\text{M}$  de Cd.

O coeficiente  $C_{\text{máx}}$  é superior na raiz em relação à parte aérea, o que está de acordo com as concentrações de Cd obtidas para cada órgão. É possível verificar que não existem grandes



diferenças na quantidade acumulada de Cd pelas duas cultivares, tanto em folha como em raiz.

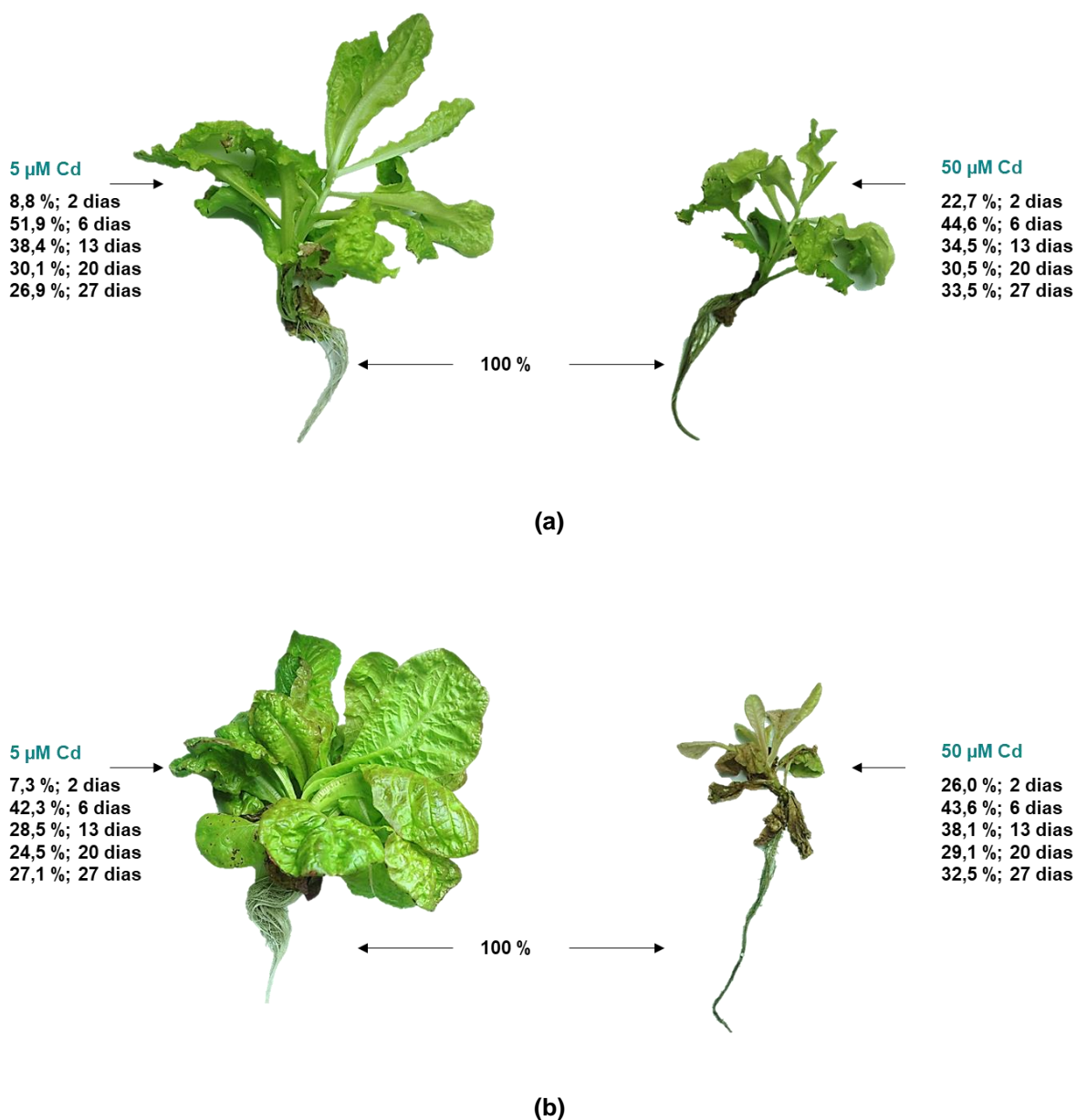
Este aumento do teor de Cd ocorre porque as raízes estão em contacto direto com o meio contaminado e o Cd entra nas células das raízes, sendo sequestrado/armazenado nos vacúolos radiculares, prevenindo a sua translocação para a parte aérea. Apesar de se verificarem efeitos visíveis de toxicidade na parte aérea, tal como se observa na **Figura 4.12**, a planta de alface parece tolerar níveis elevados de Cd nos seus tecidos. Outros autores também verificaram que as raízes acumularam preferencialmente quantidades muito superiores de Cd do que a parte aérea em alface (Choppala et al., 2014; Michalska e Asp, 2001; Zorrig et al., 2010) e em diversas plantas (Dixit et al., 2001; Ghnaya et al., 2005; Gopal e Nautiyal, 2011; Stritsis e Claassen, 2013).

Na **Figura 4.17** estão representadas as percentagens de Cd acumulado na parte aérea de plantas de alface DP (**Figura 4.17-a**) e M4E (**Figura 4.17-b**) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 5 e 50  $\mu\text{M}$  de Cd ao longo do tempo de exposição ao contaminante.

Na alface DP, para todos os tempos de exposição à exceção dos 2 dias, são translocados entre 26,9-51,9 % (5  $\mu\text{M}$ ) e 33,5-44,6 % (50  $\mu\text{M}$ ) para a parte aérea. Na alface M4E são translocados entre 27,1-42,3 % (5  $\mu\text{M}$ ) e 32,5-43,6 % (50  $\mu\text{M}$ ). As percentagens de Cd na parte aérea, refletem que existe uma diminuição das percentagens de Cd acumulado na parte aérea de ambas as cultivares de alface, evidenciando que provavelmente os transportadores estão saturados e existe um equilíbrio entre o interior da planta e o Cd presente no meio. De acordo com Prasad (2004), as plantas com comportamento de acumuladoras, em meios com elevadas concentrações de metal, contudo, não aumentam a capacidade de acumulação, provavelmente devido à competição entre os EPTs nos locais de absorção.

Com a exposição a Cd durante 2 dias, há um aumento das percentagens acumuladas de Cd entre as plantas de alface contaminadas com 5 e 50  $\mu\text{M}$  de Cd, para ambas as cultivares (DP - 5  $\mu\text{M}$ : 8,8 %; 50  $\mu\text{M}$ : 22,7 % / M4E - 5  $\mu\text{M}$ : 7,3 %; 50  $\mu\text{M}$ : 26,0 %), uma vez que existe uma maior quantidade de Cd disponível no meio contaminado.

Na planta jovem de ambas as cultivares (exposta a 5 e 50  $\mu\text{M}$  durante 2 dias), o comportamento difere dos outros tempos de exposição evidenciando que estas plantas provavelmente ainda se estão a aclimatizar à presença de Cd, não havendo ainda um equilíbrio entre Cd no interior da planta e o Cd presente na solução nutritiva.



**Figura 4.17** – Percentagens de Cd absorvido na parte aérea de plantas de alface DP (a) e M4E (b) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 5 e 50 µM de Cd ao longo do tempo de exposição ao contaminante (n=3). Na figura está representado o registo fotográfico obtido ao fim de 27 dias de exposição ao contaminante.





### *Conclusões intercalares*

Existe uma diminuição da massa fresca da parte aérea e da raiz com o aumento da concentração de cádmio em solução nutritiva, podendo-se afirmar que a parte aérea é o órgão mais afetado em termos de biomassa para as duas cultivares de alface. Esta diminuição, muito provavelmente, está relacionada com o facto de o Cd interferir com outro(s) elemento(s) que são essenciais para o crescimento da planta.

Para as duas cultivares é clara a presença de sintomas visíveis de toxicidade, tanto na raiz como na parte aérea, evidenciando o efeito tóxico do Cd para esta planta, nomeadamente, cloroses nas folhas jovens, necroses nas folhas adultas, e o escurecimento, aparecimento de ramificações laterais de menores dimensões e pontos negros nas extremidades das raízes.

A acumulação de Cd pela parte aérea e raiz apresenta um comportamento hiperbólico. As curvas de acumulação indicam que à medida que a concentração de cádmio no meio aumenta existe uma tendência para a estabilização de Cd na planta, o que pode resultar no estabelecimento de equilíbrios entre o interior da planta e o cádmio presente na solução nutritiva.

Relativamente às diferenças entre cultivares, é possível verificar que não existem grandes variações no processo de acumulação de cádmio pelas duas cultivares, tanto em folha como em raiz. Os parâmetros de ajuste obtidos ( $K_{Cd}$  e  $C_{máx}$ ) indicam que as duas cultivares de alface demonstram ter o mesmo comportamento hiperbólico na acumulação de Cd, podendo sugerir para a alface um comportamento de planta acumuladora. Nestas condições, a planta possui mecanismos de destoxificação que lhe possibilita tolerar elevadas quantidades de cádmio nos diferentes órgãos, tanto para concentrações baixas ou elevadas de Cd em solução nutritiva.

A planta não aumenta a quantidade de Cd translocada para a parte aérea, ao longo do tempo de exposição, e os valores acumulados tendem para uma estabilização, apesar dos níveis elevados de Cd em solução nutritiva.



#### 4.4.2. Crómio

##### 4.4.2.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Cr

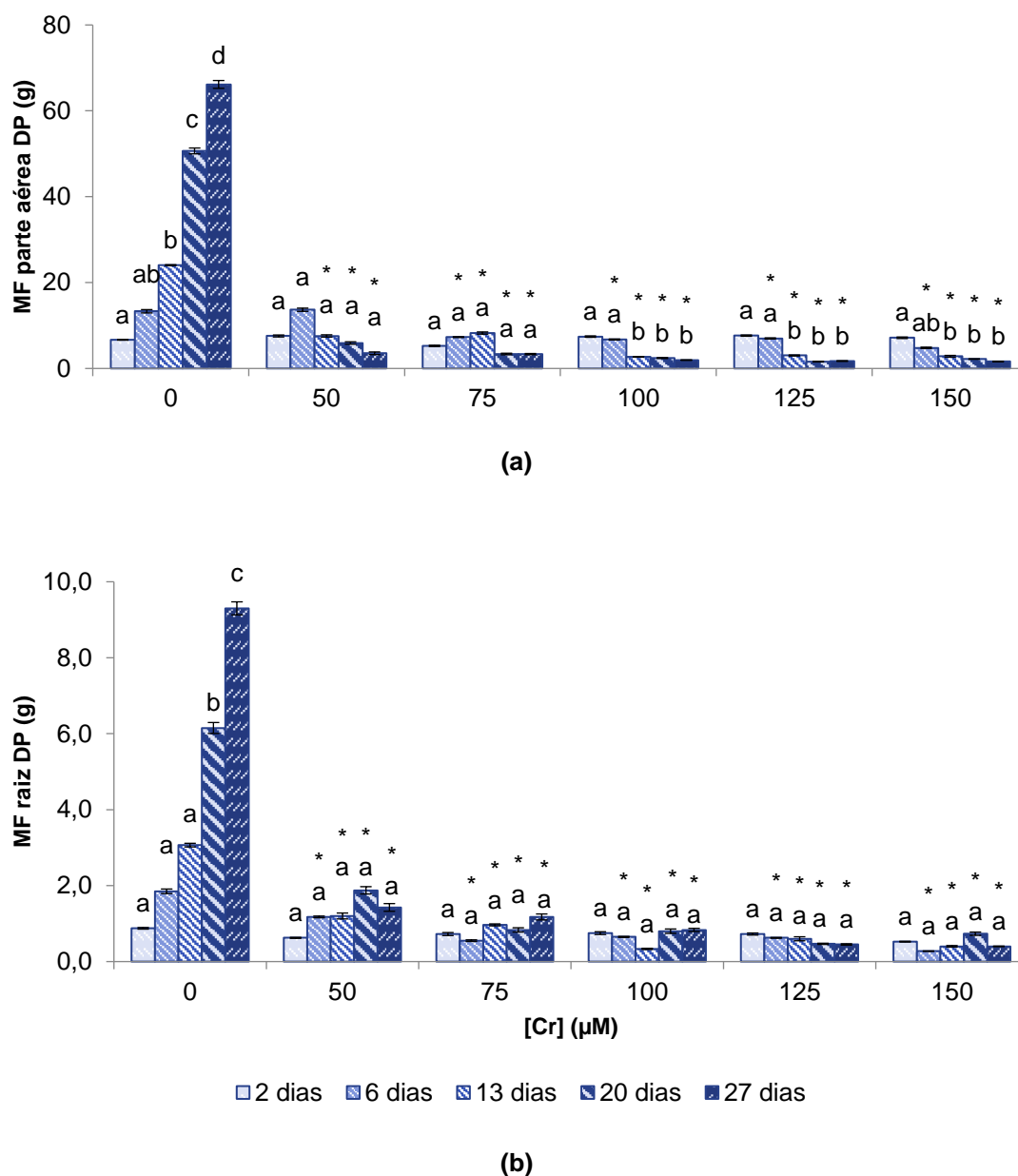
Os resultados obtidos, para a massa fresca da parte aérea e da raiz para ambas as cultivares estão apresentados nas **Figuras 4.18 e 4.19**. O registo fotográfico dos sintomas visíveis devido ao efeito tóxico de Cr encontra-se na **Figura 4.20** para as duas cultivares de alface.

Verifica-se que a massa fresca das plantas controlo aumenta ao longo do tempo o que traduz o normal crescimento da planta. No entanto, em plantas contaminadas com Cr este crescimento é muito afetado. Em ambas as cultivares de alface é evidente uma diminuição acentuada da massa fresca, tanto da parte aérea como da raiz que é proporcional ao aumento da presença de Cr na solução nutritiva.

A diminuição da massa fresca da parte aérea é estatisticamente significativa para a exposição a 75, 100, 125 e 150  $\mu\text{M}$  ao fim de todos os tempos de exposição, à exceção dos 2 dias. Nas plantas contaminadas com 50  $\mu\text{M}$  observa-se uma redução significativa apenas ao fim de 13, 20 e 27 dias, para ambas as cultivares (**Figuras 4.18-a e 4.19-a**).

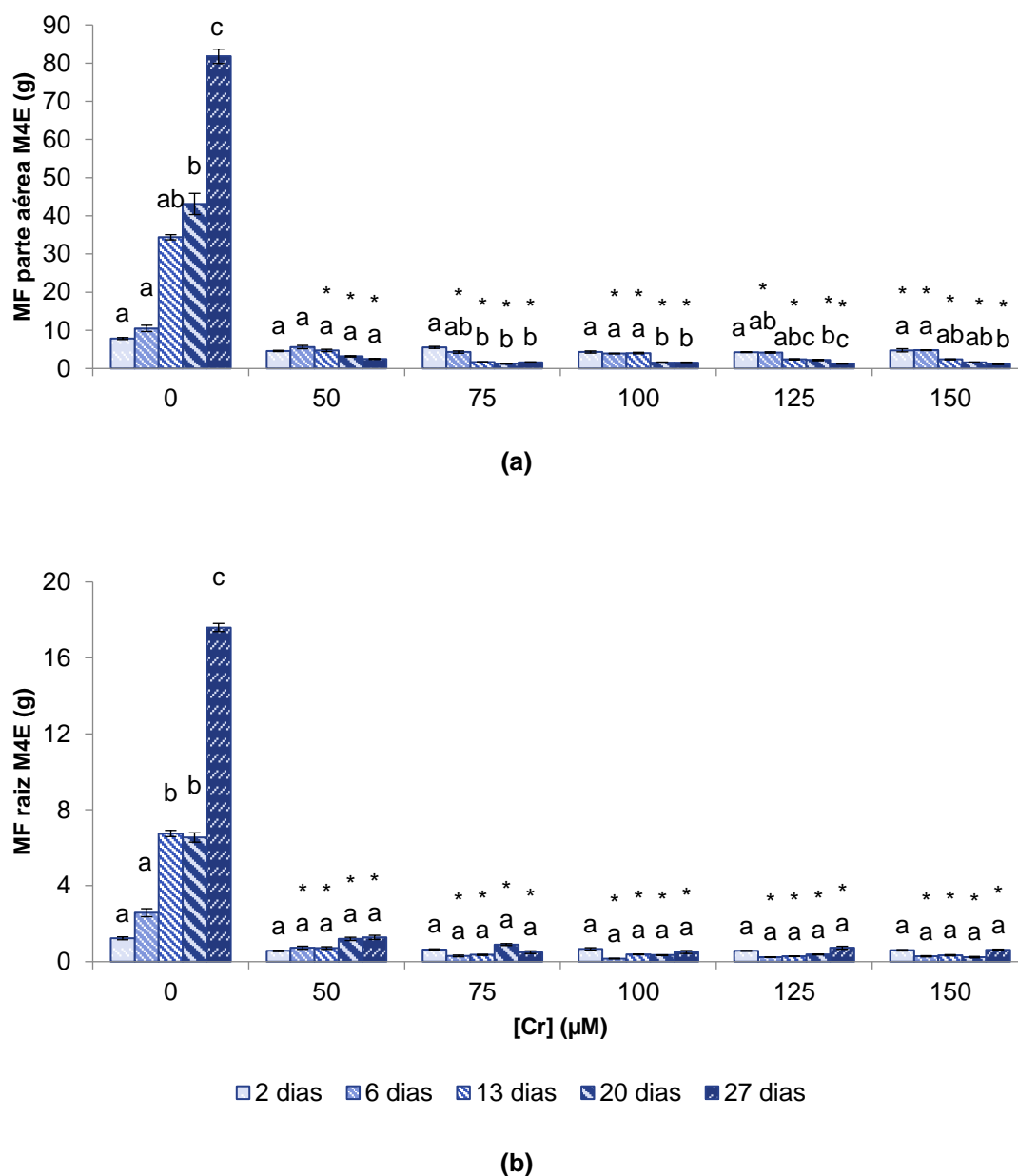
Na raiz há uma diminuição significativa para todas as concentrações de Cr aplicadas para todos os tempos de exposição, à exceção dos 2 dias, para as duas cultivares (**Figuras 4.18b e 4.19b**).

Se se calcularem os valores relativos à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz (50  $\mu\text{M}$  Cd, 27 dias) é possível verificar que no caso da alface DP existe uma diminuição de 97,5 % na parte aérea e de 95,7 % na raiz, relativamente às plantas controlo. Na alface M4E, verifica-se também uma diminuição muito acentuada de 98,6 % e de 96,4 %, para a parte aérea e raiz, respetivamente. As duas cultivares apresentam uma diminuição percentual muito semelhante e bastante elevada da biomassa da parte aérea e da raiz, logo o efeito, das concentrações de Cr escolhidas, é muito parecido em ambas as cultivares para este parâmetro.



**Figura 4.18** – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 75, 100, 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Cr.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada modalidade. O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 4.19** – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alfafa M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 75, 100, 125 e 150 µM de Cr. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada modalidade. O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



(a)



(b)

**Figura 4.20** – Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface DP (a) e M4E (b) expostas a Cr durante 27 dias.



Esta diminuição da biomassa também foi verificada por outros autores em couve-flor (Chatterjee e Chatterjee, 2000), brássicas (Gill et al., 2015; Qing et al., 2015; Terzi e Yildiz, 2014), arroz (Qiu et al., 2013; Sundaramoorthy et al., 2010), *Camellia sinensis* (Tang et al., 2012) e quinoa (Scoccianti et al., 2016). A diminuição no crescimento da raiz devido à presença de Cr é um efeito muito referido em bibliografia, tal como em *Pisum sativum* (Rodriguez et al., 2011), *Vigna radiata* (Samantary, 2002), *Medicago sativa* (Peralta et al., 2001), milho (Mallick et al., 2010) e arroz (Ahmad et al., 2011).

No presente trabalho calcularam-se os valores médios das percentagens de humidade para a biomassa da parte aérea e da raiz, relativamente ao controlo, considerando-se a exposição ao fim de 27 dias com 150  $\mu\text{M}$  de Cr. Verifica-se que existe uma elevada diminuição no teor de água da parte aérea das plantas controlo (DP: 78,1 %; M4E: 75,5 %) relativamente às plantas contaminadas (DP: 15,5 %; M4E: 44,7 %). Na raiz, também há uma tendência para a diminuição do teor de água entre as plantas sem contaminante (DP: 80,9 %; M4E: 80,4 %) e contaminadas com 150  $\mu\text{M}$  de Cr (DP: 70,3 %; M4E: 78,5 %), mas que não é tao acentuada como a verificada na parte aérea. De acordo com Hayat et al. (2012), a diminuição do tamanho da planta deve-se à diminuição do crescimento da raiz que, por consequência, leva a uma diminuição da absorção de água e nutrientes e o seu transporte para a parte aérea das plantas.

O efeito tóxico deste elemento nas plantas de alface é bastante evidente visualmente (**Figura 4.20**). Em ambas as cultivares existe uma efetiva diminuição do tamanho da planta, o aparecimento de cloroses e necroses nas folhas ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ), folhas murchas, secas e com falta de vigor, coloração avermelhada nas folhas (alface M4E), bem como o amarelecimento gradual da raiz. A presença de danos muito acentuados na planta deve-se ao efeito das concentrações de Cr escolhidas serem elevadas.

Vários autores observaram o efeito do crómio em diferentes plantas. Chatterjee e Chatterjee (2000) verificaram que as plantas de couve-flor expostas a concentrações mais elevadas de Cr tiveram uma diminuição do seu crescimento, com folhas de menores dimensões, ligeiramente murchas, falta de vigor e com o aparecimento de cloroses após 10-12 dias de exposição a 500  $\mu\text{M}$  de Cr. Em *Citrullus vulgaris* expostas a concentrações superiores a 200  $\mu\text{M}$  manifestou-se o aparecimento de cloroses, perda de vigor das folhas e uma diminuição do desenvolvimento das plantas (Dube et al. 2003). Liu et al. (2008) também observaram o aparecimento de cloroses em folhas de *Amaranthus viridis* (10  $\mu\text{M}$ , 15 dias). Hayat et al. (2012) referiram que a acumulação de Cr em plantas levou à redução do crescimento, induziu o aparecimento de cloroses em folhas jovens e à perda do teor de pigmentos. Tiwari et al. (2013)



referiram que os efeitos mais comuns de toxicidade com Cr (400  $\mu$ M, 15 dias) foi a inibição do crescimento da planta e o aparecimento de cloroses foliares em rabanete (*Raphanus sativus*). Nas condições dos ensaios do presente trabalho, todos estes sintomas visíveis de toxicidade foram observados para as plantas de alface. O comportamento observado para as duas cultivares face à presença de Cr é idêntico, sendo o seu crescimento severamente afetado.

#### 4.4.2.2. Caracterização da acumulação de Cr

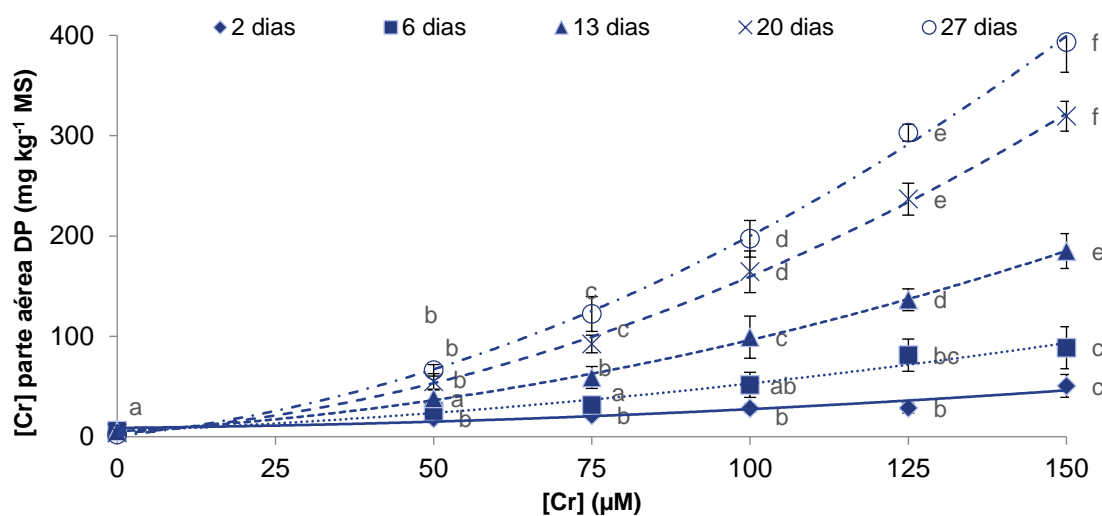
Os resultados obtidos para a acumulação de Cr na parte aérea e raiz em função das diferentes concentrações de Cr em solução nutritiva encontram-se nas **Figuras 4.21, 4.22, 4.23 e 4.24**.

Nas condições do ensaio, a acumulação de Cr apresenta um ajuste razoável ao modelo polinomial (4.3.5.2.), tal como indicam os valores de  $R^2 > 0,91$ . Este comportamento indica que à medida que se aumenta a concentração de Cr disponível no meio, existe uma acumulação crescente de Cr na planta, tanto para a parte aérea (**Figuras 4.21 e 4.23**) como na raiz (**Figuras 4.22 e 4.24**), o que indica que não há regulação dos mecanismos de entrada deste elemento na planta para elevadas concentrações de Cr disponíveis em solução. De acordo Shanker et al. (2005), o Cr pode ser absorvido como  $Cr^{3+}$  ou  $Cr^{6+}$ , mas não existe um mecanismo específico para a sua absorção, sendo absorvido por transportadores não específicos utilizados na absorção de nutrientes essenciais e água.

Outros autores também observaram um aumento da concentração de Cr nos tecidos das plantas com a exposição a crescentes concentrações deste elemento em meio contaminado (Bah et al., 2011; Chatterjee e Chatterjee, 2000; Sundaramoorthy et al., 2010; Wu et al., 2013). A presença de concentrações crescentes de Cr (10, 50 e 100  $\mu$ M), em solução nutritiva, originaram uma acumulação crescente deste elemento em oito cultivares de *Brassica napus* (Terzi e Yildiz, 2014).

Se se comparar as duas cultivares de alface, verifica-se que a acumulação de Cr teve um comportamento semelhante e em ambas se ajustou um modelo polinomial, como pode ser observado nas curvas das **Figuras 4.21 a 4.24**. Estas curvas indicam que a acumulação é mais acentuada à medida que aumenta a concentração do Cr no meio, o que pode indicar um comportamento de planta exclusora em relação a este EPT. De acordo com Prasad (2004), plantas exclusoras apresentam um efeito barreira à entrada de EPTs, restringindo a sua entrada, mas quando as concentrações destes elementos são demasiado elevadas, este efeito barreira perde-se e a acumulação aumenta de forma bastante significativa.

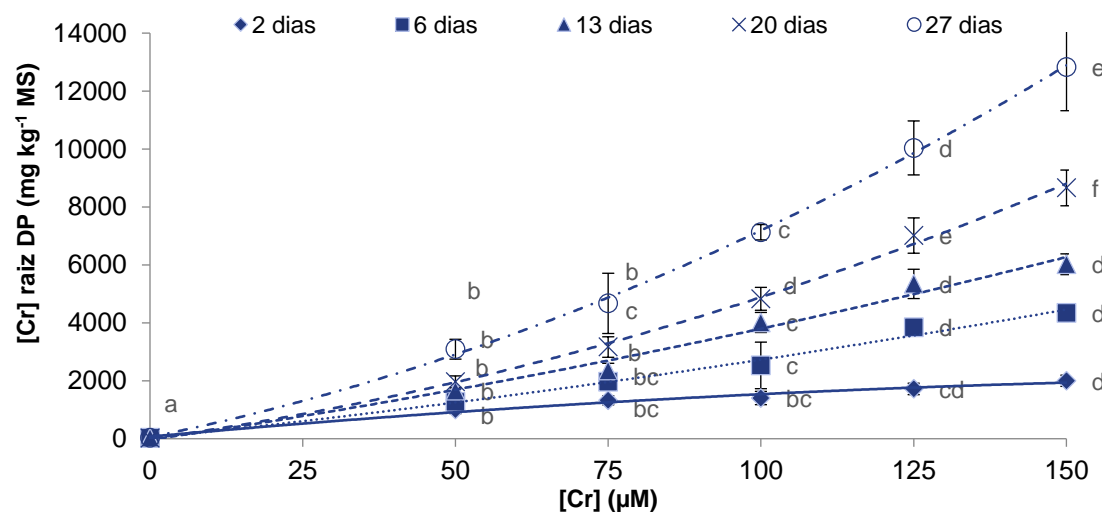




dias	$a^2$	$b$	$c$	$R^2$	Linha
2	0,001	0,062	8,781	0,9140	—
6	0,002	0,253	5,496	0,9720	.....
13	0,006	0,332	5,424	0,9988	----
20	0,011	0,443	3,179	0,9987	----
27	0,013	0,663	0,894	0,9983	-.-.-

**Figura 4.21** – Concentração de Cr na parte aérea de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 75, 100, 125 e 150 μM de Cr.

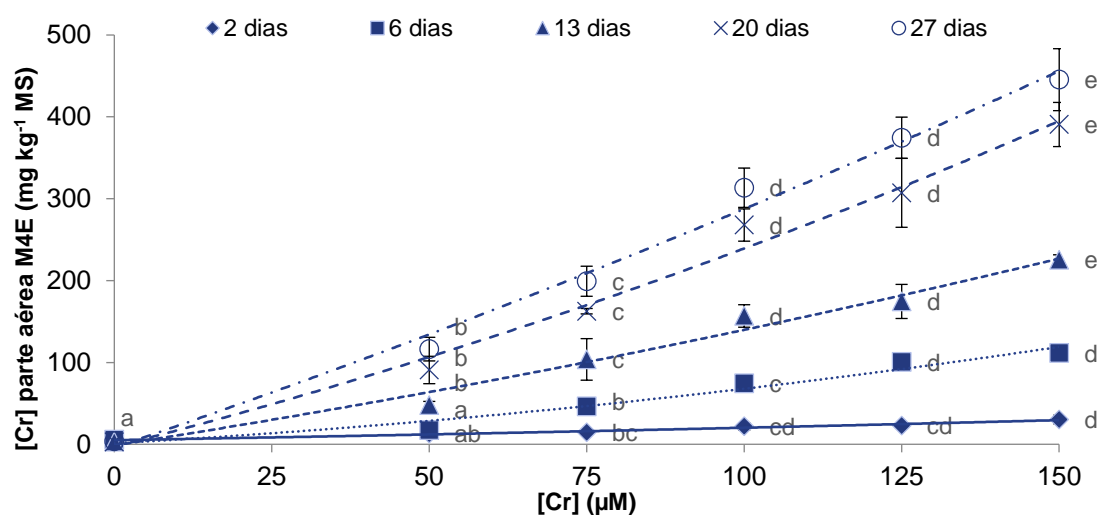
As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



dias	$a^2$	$b$	$c$	$R^2$	Linha
2	-0,045	19,132	72,052	0,9841	—
6	0,051	21,952	26,517	0,9897	.....
13	0,074	30,942	-38,154	0,9861	----
20	0,197	29,144	0,279	0,9975	----
27	0,284	42,926	54,807	0,9990	-.-.-

**Figura 4.22** – Concentração de Cr na raiz de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 75, 100, 125 e 150 μM de Cr.

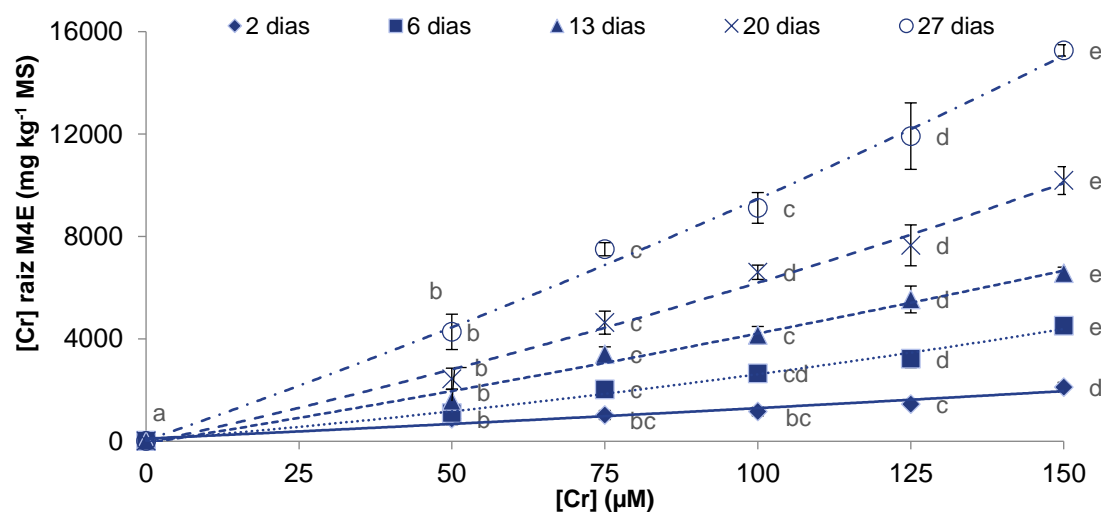
As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



dias	$a^2$	$b$	$c$	$R^2$	Linha
2	0,0002	0,1286	5,0391	0,9773	—
6	0,0024	0,4260	1,3564	0,9664	.....
13	0,0022	1,1902	-1,2535	0,9816	----
20	0,0046	1,9607	-2,9542	0,9883	----
27	0,0030	2,6111	-3,8902	0,9908	-.-.-

**Figura 4.23** – Concentração de Cr na parte aérea de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 75, 100, 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Cr.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



dias	$a^2$	$b$	$c$	$R^2$	Linha
2	0,009	11,039	103,360	0,9488	—
6	0,064	19,456	37,332	0,9912	.....
13	0,041	38,761	-79,686	0,9898	----
20	0,101	52,493	-69,264	0,9921	----
27	0,118	82,461	34,781	0,9956	-.-.-

**Figura 4.24** – Concentração de Cr na raiz de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 75, 100, 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Cr.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



Uma explicação para o aumento de acumulação de Cr nas raízes pode ser a presença de ácidos orgânicos nos exsudados das raízes que formam complexos com o Cr que, dessa forma, se tornam mais disponíveis para serem absorvidos (Hayat et al., 2012).

Efetivamente, verifica-se que a planta de alface acumula preferencialmente este elemento na raiz, em ambas as cultivares. Ao fim de 2 dias de exposição as raízes acumulam  $1000,80 \pm 135,6$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MS (DP) e  $874,10 \pm 221,80$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MS (M4E) quando sujeitas a 50  $\mu\text{M}$  de Cr. As folhas acumulam  $18,20 \pm 0,67$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MS (DP) e  $12,95 \pm 2,25$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MS (M4E) quando sujeitas a 50  $\mu\text{M}$  de Cr. Na planta adulta, as raízes acumulam  $12822,9 \pm 1501,3$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MF (DP) e  $15267,6 \pm 220,4$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MF (M4E), quando expostas durante 27 dias, a 150  $\mu\text{M}$  de Cr. As folhas acumulam  $393,38 \pm 30,14$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MF (DP) e  $445,45 \pm 37,84$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MF (M4E), quando expostas durante 27 dias, a 150  $\mu\text{M}$  de Cr.

Segundo a bibliografia, em outras variedades de alface também se verificou que este elemento se acumulou preferencialmente na raiz (Chakraborty et al., 2014). Outros autores também verificaram efeitos semelhantes em diferentes plantas. Em plantas de couve-flor, o Cr ficou retido maioritariamente na raiz e apenas uma proporção mínima foi translocada para a parte aérea, tal como descrito por Chatterjee e Chatterjee (2000). Shanker et al. (2005) referiram que, de forma geral, nas plantas a translocação do Cr da raiz para a parte aérea é baixa, em espécies de *Vigna*. Tiwari et al. (2013) verificaram em rabanete que após 15 dias de exposição a 400  $\mu\text{M}$  de Cr, a acumulação foi máxima para as raízes ( $327,6$  mg  $\text{kg}^{-1}$ ), seguido das folhas ( $116,7$  mg  $\text{kg}^{-1}$ ). Em *C. arvensis*, o Cr também se acumulou preferencialmente na raiz (Gardea-Torresdey et al., 2004), bem como em 4 cultivares de *Brassica napus* (Gill et al., 2015). Em plantas de quinoa expostas a concentrações de Cr entre 10-5000  $\mu\text{M}$ , verificou-se que nas folhas se acumulou uma pequena quantidade de Cr, sendo na raiz que se acumula uma maior concentração deste elemento, tanto na presença de baixas ou elevadas concentrações de Cr em solução nutritiva (Scoccianti et al., 2016).

Na **Figura 4.25** estão representadas as percentagens de Cr acumulado na parte aérea de plantas de alface DP (**Figura 4.25-a**) e M4E (**Figura 4.25-b**) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 50 e 150  $\mu\text{M}$  de Cr ao longo do tempo de exposição ao contaminante.

Através da observação das figuras é possível verificar que a percentagem de Cr que é translocada para a parte aérea é muito baixa para ambas as cultivares. Na alface DP, para todos os tempos de exposição, são translocados entre 1,8-2,8 % (50  $\mu\text{M}$ ) e 2,0-3,7 % (150



$\mu\text{M}$ ) para a parte aérea. Na alface M4E são translocados entre 1,5-3,7 % (50  $\mu\text{M}$ ) e 1,4-3,8 % (150  $\mu\text{M}$ ).

As percentagens de Cr na parte aérea, refletem que não existe grande variação entre os valores das percentagens de Cr translocado para a parte aérea em função do tempo de exposição e da concentração de Cr presente em solução nutritiva, para ambas as cultivares de alface.

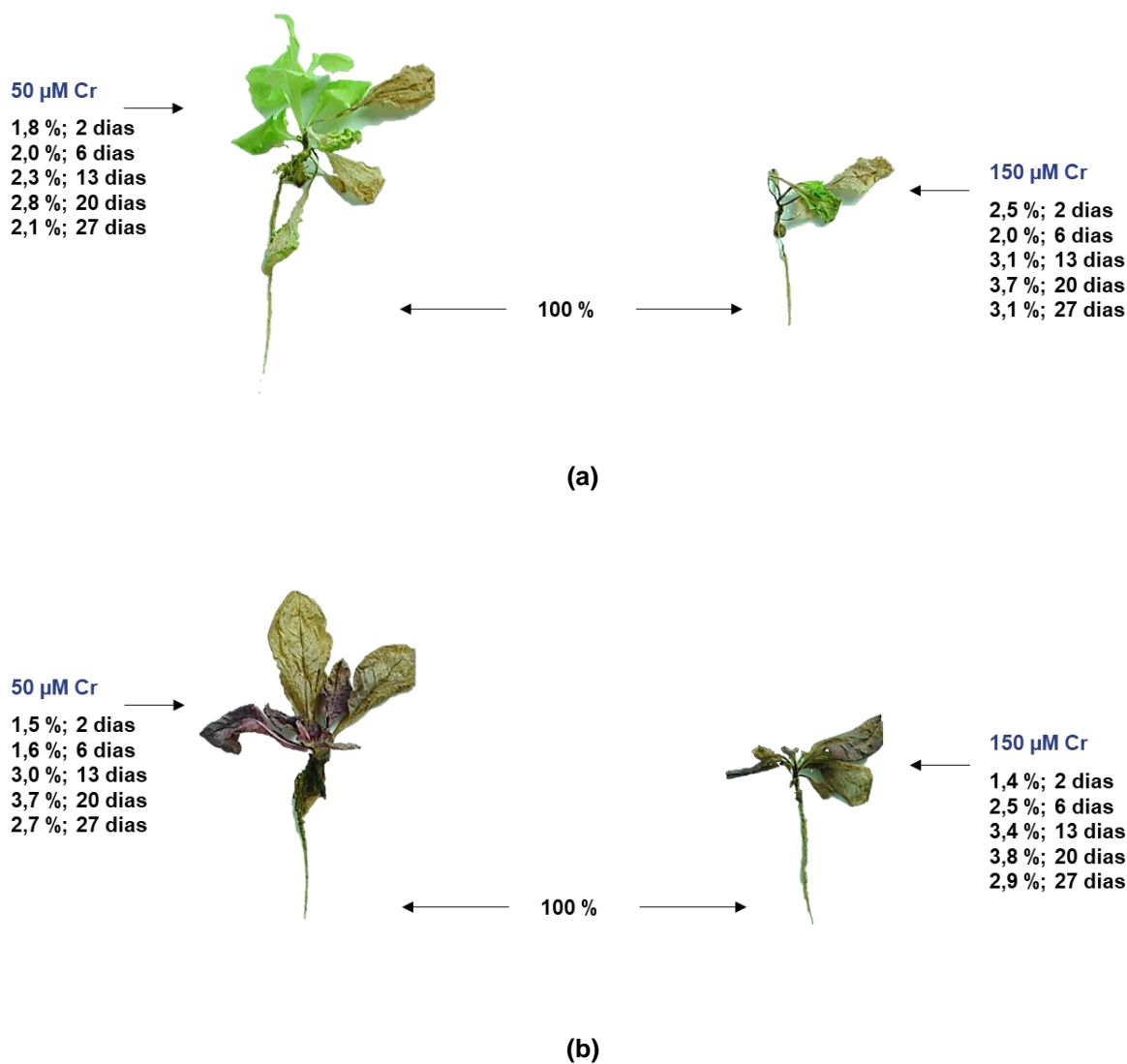
#### *Conclusões intercalares*

Há uma diminuição acentuada da massa fresca da parte aérea e da raiz em função do aumento da presença de Cr na solução nutritiva. As duas cultivares apresentam uma diminuição percentual da biomassa muito elevada e semelhante para ambos os órgãos. O decréscimo do tamanho da planta pode ser explicado pela diminuição da absorção de água e de outros nutrientes essenciais ao crescimento normal da planta.

O efeito tóxico de crómio nas plantas de alface é bastante evidente visualmente, nomeadamente, o aparecimento de folhas murchas e com falta de vigor (provavelmente devido à diminuição do teor de água), cloroses e necroses nas folhas e o amarelecimento da raiz.

A acumulação de Cr apresenta um comportamento explicado por um modelo polinomial. Este comportamento indica que à medida que se aumenta a concentração de Cr disponível em solução nutritiva, existe uma acumulação crescente de Cr na parte aérea e na raiz, para ambas as cultivares. Este comportamento evidencia que os mecanismos de entrada na planta são afetados e a acumulação aumenta de forma considerável, o que poderá indicar um comportamento de planta exclusora de crómio na alface.

De acordo com os resultados obtidos verifica-se que a percentagem de crómio que é translocada para a parte aérea é muito baixa, pelo que o crómio se acumula preferencialmente na raiz em ambas as cultivares.



**Figura 4.25** – Percentagens de Cr na parte aérea de plantas de alface DP (a) e M4E (b) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 50 e 150  $\mu$ M de Cr ao longo do tempo de exposição ao contaminante (n=3). Na figura está representado o registro fotográfico obtido ao fim de 27 dias de exposição ao contaminante.



#### 4.4.3. Chumbo

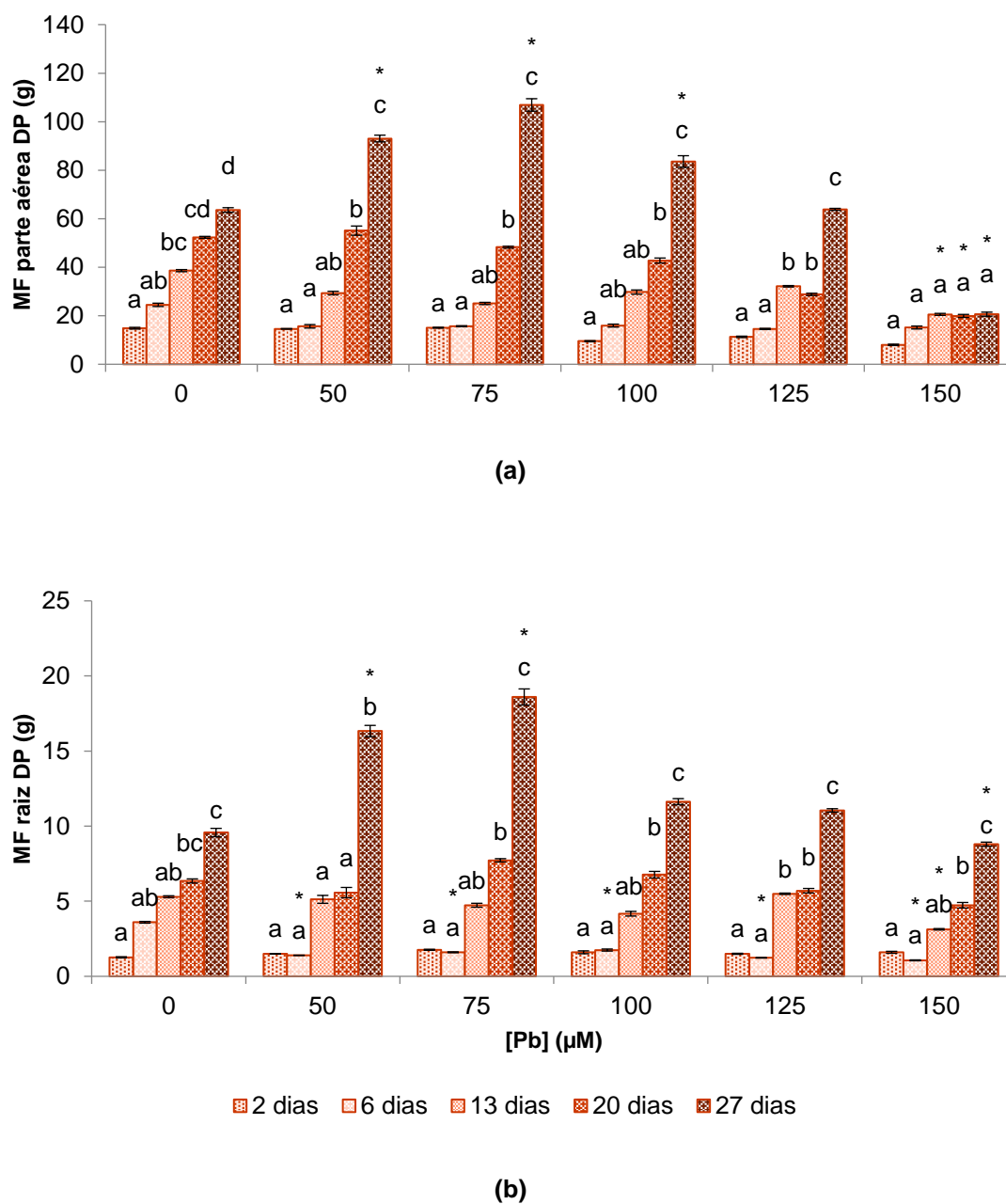
##### 4.4.3.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Pb

Nas **Figuras 4.26, 4.27 e 4.28** estão representados os resultados obtidos para os parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade de plantas expostas a diferentes concentrações de Pb. É possível verificar que um aumento de Pb em solução nutritiva apenas afeta os parâmetros vegetativos em estudo para tempos e concentrações de Pb mais elevados.

A massa fresca das plantas controlo aumenta ao longo do tempo o que reflete o crescimento normal da planta, sendo este comportamento também observado em plantas contaminadas ao contrário do que seria de esperar. Na alface DP, a presença de Pb leva a um estímulo do crescimento da parte aérea em plantas expostas a 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  de Pb, ao fim de 27 dias. Para além deste efeito existe uma diminuição significativa, comparativamente ao controlo, na massa fresca da parte aérea de plantas expostas a 150  $\mu\text{M}$  de Pb, durante 13, 20 e 27 dias (**Figura 4.26-a**). Na massa fresca da raiz existe um aumento significativo da biomassa da raiz ao fim de 27 dias de exposição a 50 e 75  $\mu\text{M}$  de Pb. Com a exposição a 150 de Pb durante 13, 20 e 27 dias resulta numa diminuição significativa, por comparação com as plantas controlo (**Figura 4.26-b**).

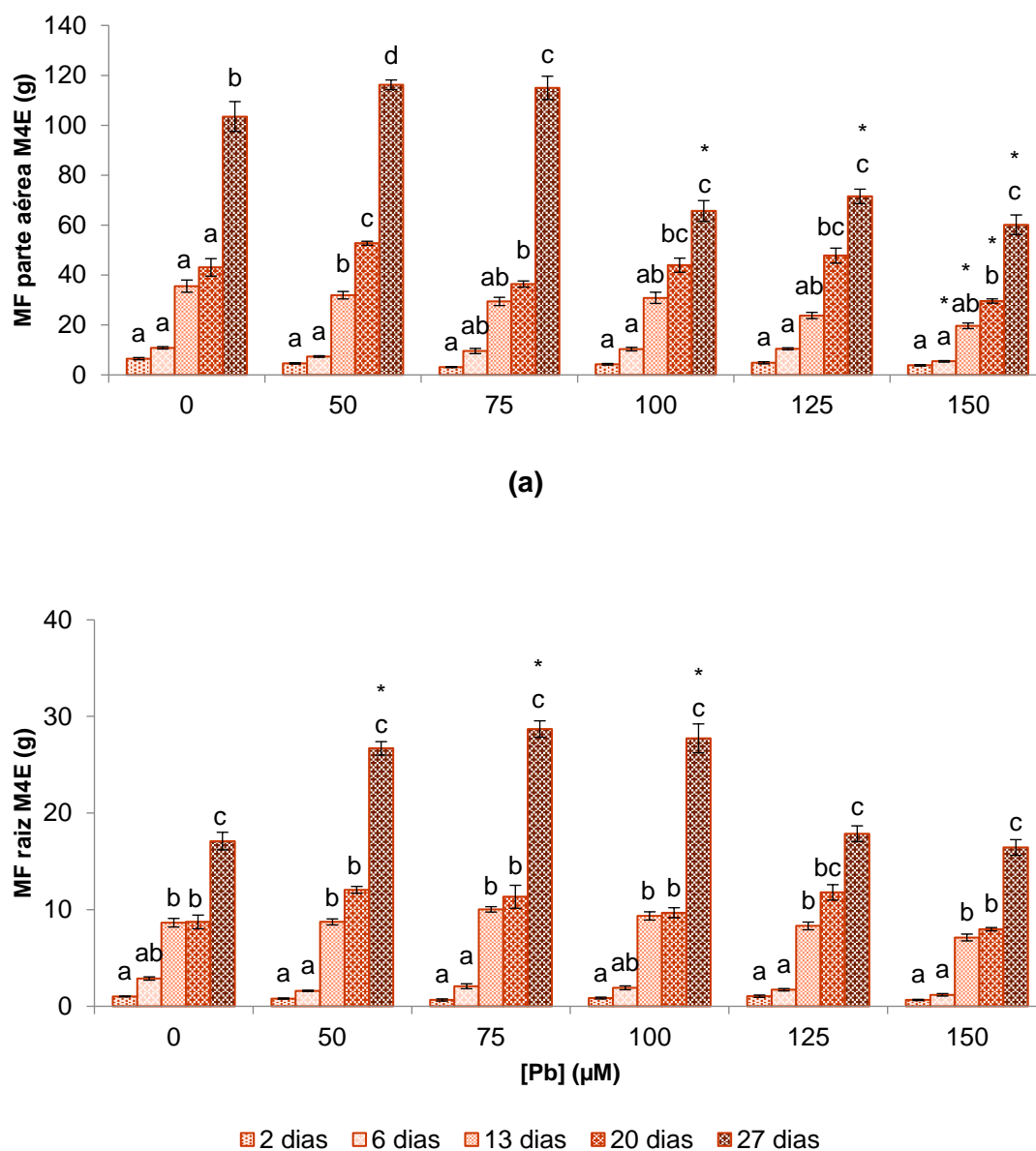
Na alface M4E, existe uma diminuição significativa na biomassa da parte aérea com a exposição a 100 (27 dias), 125 (27 dias) e 150 (6, 13, 20, 27 dias)  $\mu\text{M}$  de Pb em relação às plantas sem adição de contaminante (**Figura 4.27-a**). Na raiz apenas se observa um estímulo do crescimento da raiz com a exposição durante 27 dias a 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  de Pb (**Figura 4.27-b**).

Apesar de o Pb não ser um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas, existem alguns estudos onde também foi verificado o estímulo do crescimento das plantas observado neste trabalho. Bah et al. (2011) observaram um ligeiro aumento da biomassa da parte aérea e da raiz, em plantas *Typha angustifolia*, expostas durante 130 dias, a 1000  $\mu\text{M}$  de Pb (uma concentração consideravelmente mais elevada que as usadas neste trabalho). Michalska e Asp (2001) verificaram que a presença de 500  $\mu\text{M}$  de Pb, em solução nutritiva, levou a um aumento da biomassa das folhas, mas não das raízes.



**Figura 4.26** – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 75, 100, 125 e 150 µM de Pb. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada modalidade. O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).

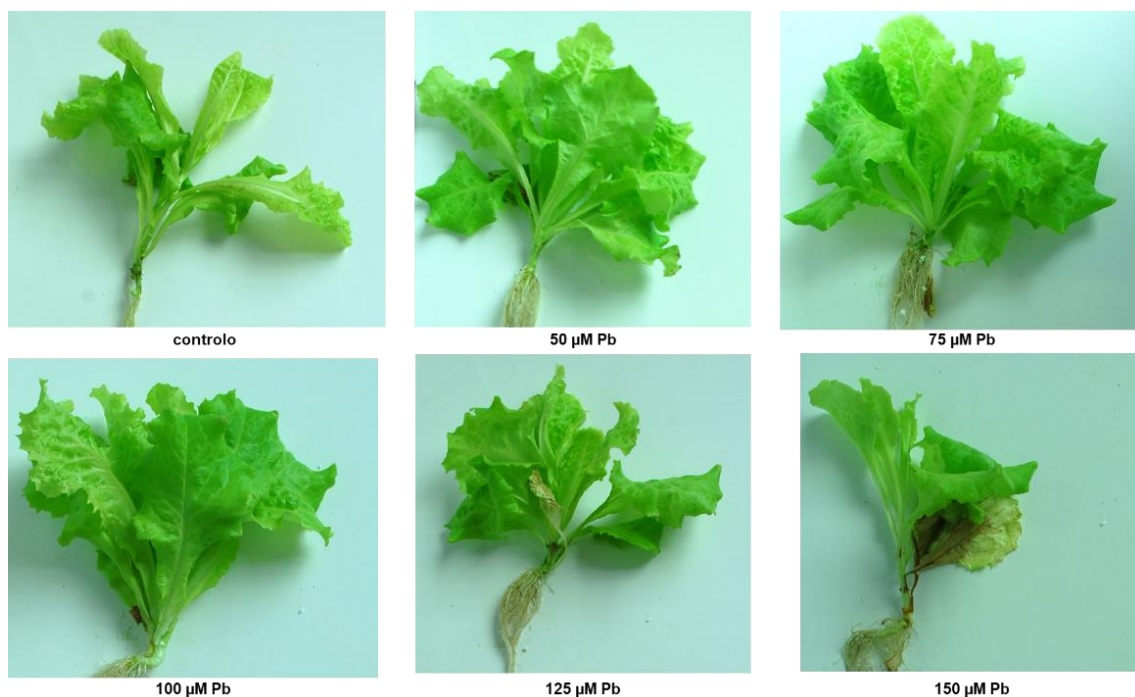




**(b)**

**Figura 4.27** – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 75, 100, 125 e 150 µM de Pb. Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface M4E (c) expostas a Pb durante 27 dias.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada modalidade. O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



(a)



(b)

**Figura 4.28** – Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface DP (a) e M4E (b) expostas a Pb durante 27 dias.



Em plantas de *Sesuvium portulacastrum*, expostas a 200 e 400  $\mu\text{M}$  não se observaram diferenças significativas na massa fresca da planta, no entanto na presença de concentrações superiores (800 e 1000  $\mu\text{M}$ ), já se verificou um efeito notório (Ghnaya et al., 2013). No entanto, outros estudos referem o efeito tóxico do Pb na biomassa de plantas de tabaco (Alkhatib et al., 2013), *Sesbania Exaltata* (McComb et al., 2012), tomate (Akinci et al., 2010), trigo e espinafre (Lamhamdi et al., 2013), *Brassica juncea* (John et al., 2009; Zaier et al., 2010), *Brassica oleracea* (Sinha et al., 2006) e arroz (Srivastava et al., 2014).

Se se considerar a exposição a 150  $\mu\text{M}$  de Pb ao fim de 27 dias, e calculando-se os valores relativos à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controlo, é possível confirmar este efeito. Na alface M4E verifica-se uma diminuição de 41,9 % e de 3,9 %, para a parte aérea e raiz, respetivamente. No caso da alface DP existe uma diminuição de 67,6 % na parte aérea e de apenas 8,1 % na raiz, sendo esta cultivar mais afetada pela presença de Pb. Nas duas cultivares, através da observação dos gráficos é possível verificar que a parte aérea é muito mais afetada em termos de biomassa que a raiz, onde se observam percentagens de diminuição muito baixas.

Vários estudos com metais pesados demonstraram uma diminuição no teor de água em plantas contaminadas com Pb (Fazal e Tariq, 2015; Rucińska-Sobkowiak, 2016). No presente trabalho calcularam-se os valores médios das percentagens de humidade para a biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controlo, considerando-se a exposição ao fim de 27 dias com 150  $\mu\text{M}$  de Pb.

Na alface DP observa-se que existe uma redução no teor de água das plantas controlo (parte aérea: 79,2 %; raiz: 82,1 %) em relação às plantas contaminadas (parte aérea: 57,9 % e raiz: 77,2 %), sendo essa diminuição superior na parte aérea. Na alface M4E verifica-se que há diminuição no teor de água das plantas controlo (parte aérea: 79,0 %; raiz: 81,5 %) em relação às plantas contaminadas (parte aérea: 74,0 % e raiz: 75,6 %). A presença de Pb, provavelmente, interfere com a absorção de água pela planta, podendo isso estar relacionado com os resultados obtidos para a diminuição da biomassa observada para as concentrações e tempos de exposição mais elevados. Este efeito é maior na cultivar DP.

Em ambas as cultivares, contaminadas com Pb, não se observaram sintomas visíveis de toxicidade tão intensos como os observados com os outros EPTs. Apenas se verifica uma ligeira diminuição no tamanho das plantas, o que está de acordo com os resultados obtidos para os parâmetros vegetativos, e o aparecimento de cloroses e necroses ligeiras em folhas adultas (**Figura 4.28**). Os resultados obtidos neste trabalho para as duas cultivares de alface



indicam que, provavelmente, seriam necessárias concentrações de Pb superiores para ser observado um efeito visível mais acentuado na planta.

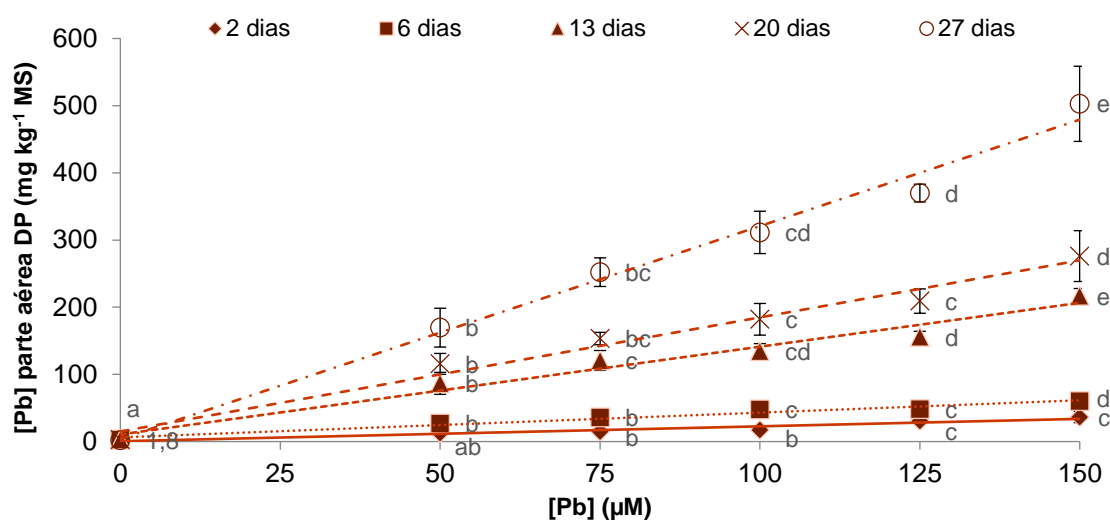
Outros autores, talvez por utilizarem concentrações de Pb bastante inferiores às do presente trabalho, também observaram que plantas de alface contaminadas com Pb (0,05  $\mu\text{M}$ , 7 dias) não apresentaram sintomas visíveis de toxicidade, possivelmente devido a uma restrição no transporte deste elemento para a parte aérea (Michalska e Asp, 2001). Kopittke et al. (2007) observaram que as plantas de *Vigna unguiculata* expostas a 0,5-2,5  $\mu\text{M}$  de Pb se mantiveram com um aspeto saudável sem sintomas óbvios de toxicidade, em relação às plantas controlo. Contudo, verificou-se a presença de folhas mais pálidas em plantas que cresceram em meios contaminados com concentrações de Pb superiores a 0,64  $\mu\text{M}$ . Os autores referiram que esta leve clorose teve origem na deficiência em Mg.

Outro estudo descreveu que as plantas expostas a 20  $\mu\text{M}$  de Pb exibiram suaves cloroses e, em geral, demonstraram ser bastante tolerantes à presença deste elemento (McComb et al., 2012), tal como acontece para as plantas de alface neste trabalho. Pelo contrário, num estudo realizado por Ghnaya et al. (2013), os autores já utilizaram concentrações superiores de Pb (0, 200, 400, 800 e 1000  $\mu\text{M}$ ) e observaram o seu efeito tóxico do Pb ao fim de 7 dias de exposição em folhas jovens de *Brassica juncea*. As plantas evidenciaram sintomas visíveis de toxicidade, como o aparecimento de cloroses, que ao longo do tempo, ficaram mais intensas e apareceram necroses nas folhas adultas. Pelo contrário, no mesmo estudo verificou-se que as plantas de *Sesuvium portulacastrum* não apresentaram sintomas até à exposição com 800  $\mu\text{M}$  de Pb.

#### 4.4.3.2. Caracterização da acumulação de Pb

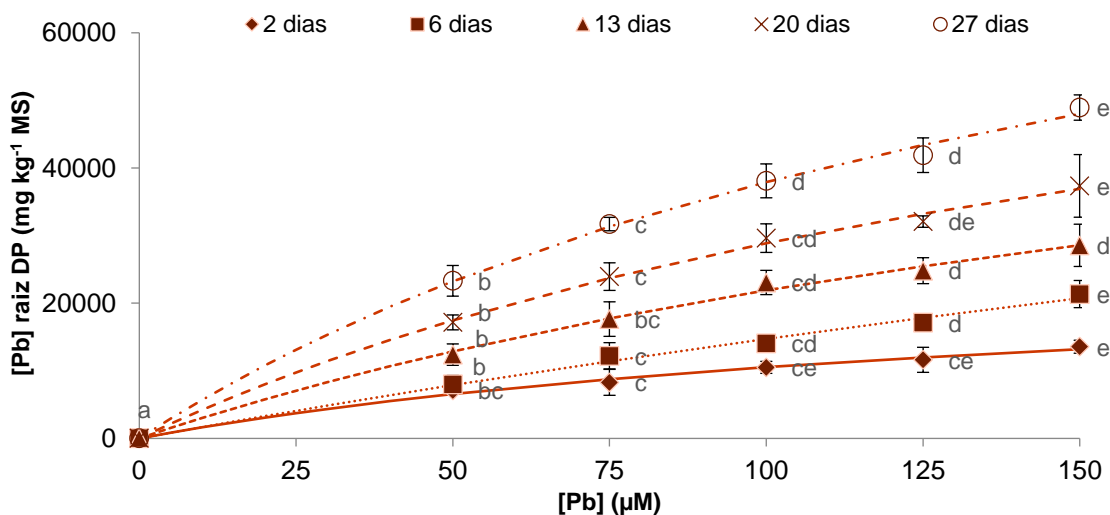
Os resultados obtidos para a acumulação de Pb, foliares e radiculares, em função das diferentes concentrações de Pb em solução nutritiva encontram-se nas **Figuras 4.29-4.32**.

A acumulação de Pb na parte aérea das duas cultivares de alface apresenta um ajuste razoável ao modelo linear, tal como indicam os valores de  $R^2 > 0,92$ . Este comportamento linear reflete que à medida que a concentração de Pb em solução nutritiva aumenta, há uma acumulação proporcional de Pb na parte aérea das plantas de alface.



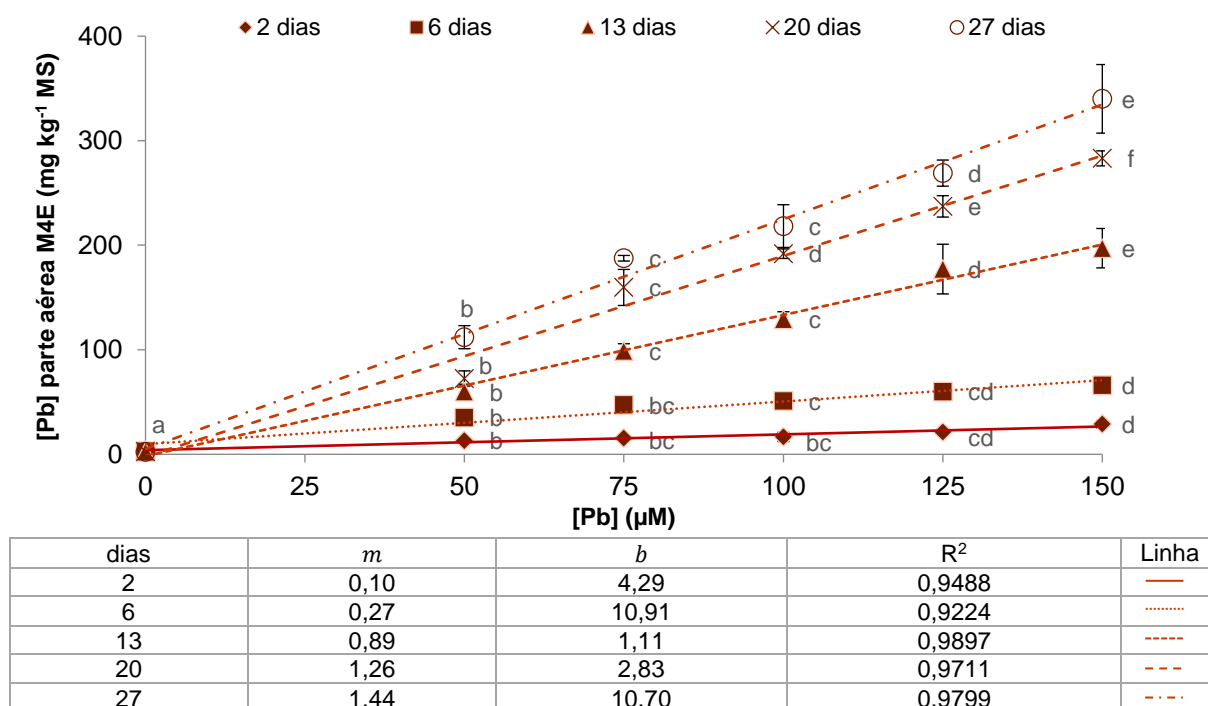
**Figura 4.29** – Concentração de Pb na parte aérea de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 75, 100, 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



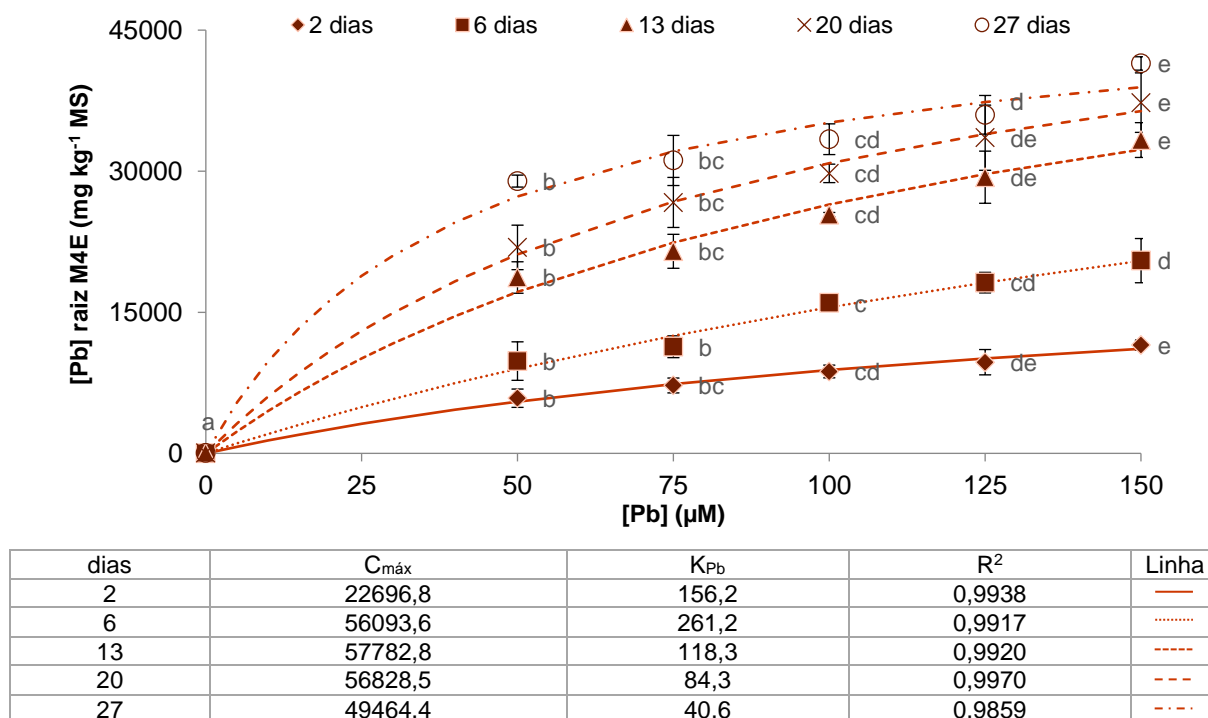
**Figura 4.30** – Concentração de Pb na raiz de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 75, 100, 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 4.31** – Concentração de Pb na parte aérea de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 75, 100, 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 4.32** – Concentração de Pb na raiz de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 75, 100, 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



Nas duas cultivares, a acumulação de Pb na parte aérea das plantas tende a aumentar uma vez que existem diferenças significativas nos valores de concentração de Pb acumulados neste órgão, entre plantas expostas a 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb para os tempos de exposição mais longos (13, 20 e 27 dias). Para tempos curtos (DP: 2 dias, M4E: 2 e 6 dias), já não existem diferenças significativas entre plantas contaminadas com 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb (**Figuras 4.29 e 4.31**).

Na raiz, a acumulação de Pb apresenta um comportamento hiperbólico (**4.3.5.2.**), tal como indicam os valores de  $R^2 > 0,99$ . Este ajuste está representado pelas linhas das **Figuras 4.30-4.32**, onde estão também indicados os parâmetros desse ajuste

Os parâmetros obtidos mostram que as duas cultivares de alface têm o mesmo comportamento hiperbólico na acumulação de Pb pela raiz (**Figuras 4.30-4.32**). Os resultados indicam que, quando existe um maior tempo de exposição ao Pb há uma maior acumulação deste elemento na raiz, uma vez que o Pb presente em solução nutritiva está disponível durante um maior período de tempo. Por esta razão, existe um aumento do  $C_{\text{máx}}$  à medida que as plantas são expostas durante mais tempo ao EPT. Este comportamento é notório na cultivar DP, e no caso da alface M4E, os  $C_{\text{máx}}$  calculados tendem para um valor aproximado para todos os tempos estudados (exceto os 2 dias).

O  $K_{\text{Pb}}$  caracteriza o processo de acumulação de Pb. Para todos os tempos de exposição verifica-se que o mecanismo de acumulação é semelhante e descrito pelo mesmo tipo de modelo em que o  $K_{\text{Pb}}$  pode dar uma indicação sobre a facilidade do Pb entrar na planta. No caso da alface M4E, há uma diminuição do valor  $K_{\text{Pb}}$  ao fim de 27 dias, indicando a possibilidade de existir maior facilidade de entrada na planta. Os valores de  $C_{\text{máx}}$  e  $K_{\text{Pb}}$  obtidos, são coerentes e ambos indicam que o processo de acumulação parece ser mais dependente do tempo de exposição do que da concentração do elemento no meio. Estes parâmetros do ajuste permitem verificar uma diferença entre as duas cultivares em estudo, dado que na alface DP isto não se verifica.

Este comportamento hiperbólico reflete que à medida que se aumenta a concentração de Pb na solução nutritiva, a planta acumula uma maior quantidade deste elemento na raiz e existe uma tendência para a estabilização de Pb na planta, o que pode resultar da saturação dos transportadores e do estabelecimento de equilíbrios entre o interior da planta e o Pb presente na solução.

As plantas de alface acumulam uma maior concentração de Pb nas raízes comparativamente à parte aérea. A acumulação na raiz condiciona a quantidade de chumbo que posteriormente





é translocada para a parte aérea. Ao fim de 2 dias de exposição, a 50  $\mu\text{M}$  de Pb, as folhas acumulam  $12,24 \pm 1,00$  mg de Pb  $\text{kg}^{-1}$  MS (DP) e  $13,13 \pm 1,73$  mg de Pb  $\text{kg}^{-1}$  MS (M4E). As raízes acumulam uma quantidade muito superior:  $7088,82 \pm 510,28$  mg de Pb  $\text{kg}^{-1}$  MS (DP) e  $5865,46 \pm 975,73$  mg de Pb  $\text{kg}^{-1}$  MS (M4E). Na planta adulta, as folhas acumulam  $502,78 \pm 55,95$  mg de Pb  $\text{kg}^{-1}$  MF (DP) e  $340,06 \pm 32,80$  mg de Pb  $\text{kg}^{-1}$  MF (M4E), quando expostas durante 27 dias, a 150  $\mu\text{M}$  de Pb. Por outro lado, as raízes acumulam uma quantidade bastante elevada de Pb,  $48942,32 \pm 1867,27$  mg de Pb  $\text{kg}^{-1}$  MF (DP) e  $41458,00 \pm 709,15$  mg de Pb  $\text{kg}^{-1}$  MF (M4E). Ao fim de 27 dias de exposição, é possível verificar que a alface DP acumula uma maior quantidade de Pb nos seus órgãos.

Este aumento da acumulação de Pb em plantas sujeitas à exposição com Pb também tem sido verificado por outros autores em alface (Michalska e Asp, 2001) e noutras plantas (Ghnaya et al., 2013; Lamhamdi et al., 2011; Liao et al., 2006; McComb et al., 2012; Wu et al., 2013; Zaier et al., 2010).

Tal como referido em **4.2.3.3.**, quando o Pb entra via apoplasto a sua entrada é bloqueada pela endoderme, que tem uma importante função de barreira física parcial, e apenas uma pequena fração de Pb se desloca via simplasto através dos tecidos vasculares e se difunde para outros órgãos da planta. Nas células da endoderme, a maior parte do Pb é sequestrado ou excretado pelos sistemas de destoxificação. Na superfície das raízes, a restrição na absorção de Pb baseia-se na ligação de Pb aos locais de troca iónica na parede celular e/ou à sua precipitação na forma carbonatada que se deposita nas paredes celulares. Existem várias razões para que o transporte do Pb das raízes para a parte aérea seja limitado, nomeadamente a sua imobilização nas paredes celulares, precipitação de sais de Pb insolúveis nos espaços intercelulares, acumulação nas membranas plasmáticas ou sequestração nos vacúolos das raízes.

De acordo com Alkhatib et al. (2013), a acumulação de Pb foi preferencial nas paredes celulares e nos tecidos vasculares das raízes de plantas de tabaco expostas a 100 e 500  $\mu\text{M}$  de Pb e referiram uma restrição no movimento deste elemento para a parte superior da planta. O facto de a raiz ser o local preferencial de toxicidade do Pb também tem sido verificado por outros autores, nomeadamente em alface e que o Pb é armazenado nas raízes ou na superfície da raiz (Liao et al., 2006; Michalska e Asp, 2001). Outros autores também encontraram resultados semelhantes em *Vigna unguiculata* (Kopittke et al., 2007), *Brassica juncea* (Ghnaya et al., 2013; Liu et al., 2000), *Brassica oleracea* (Sinha et al., 2006) e arroz (Srivastava et al., 2014).



Estes resultados estão de acordo com os valores obtidos para as percentagens de Pb translocadas para a parte aérea de plantas de alface DP (**Figura 4.33-a**) e M4E (**Figura 4.33-b**) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 50 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb ao longo do tempo de exposição ao contaminante.

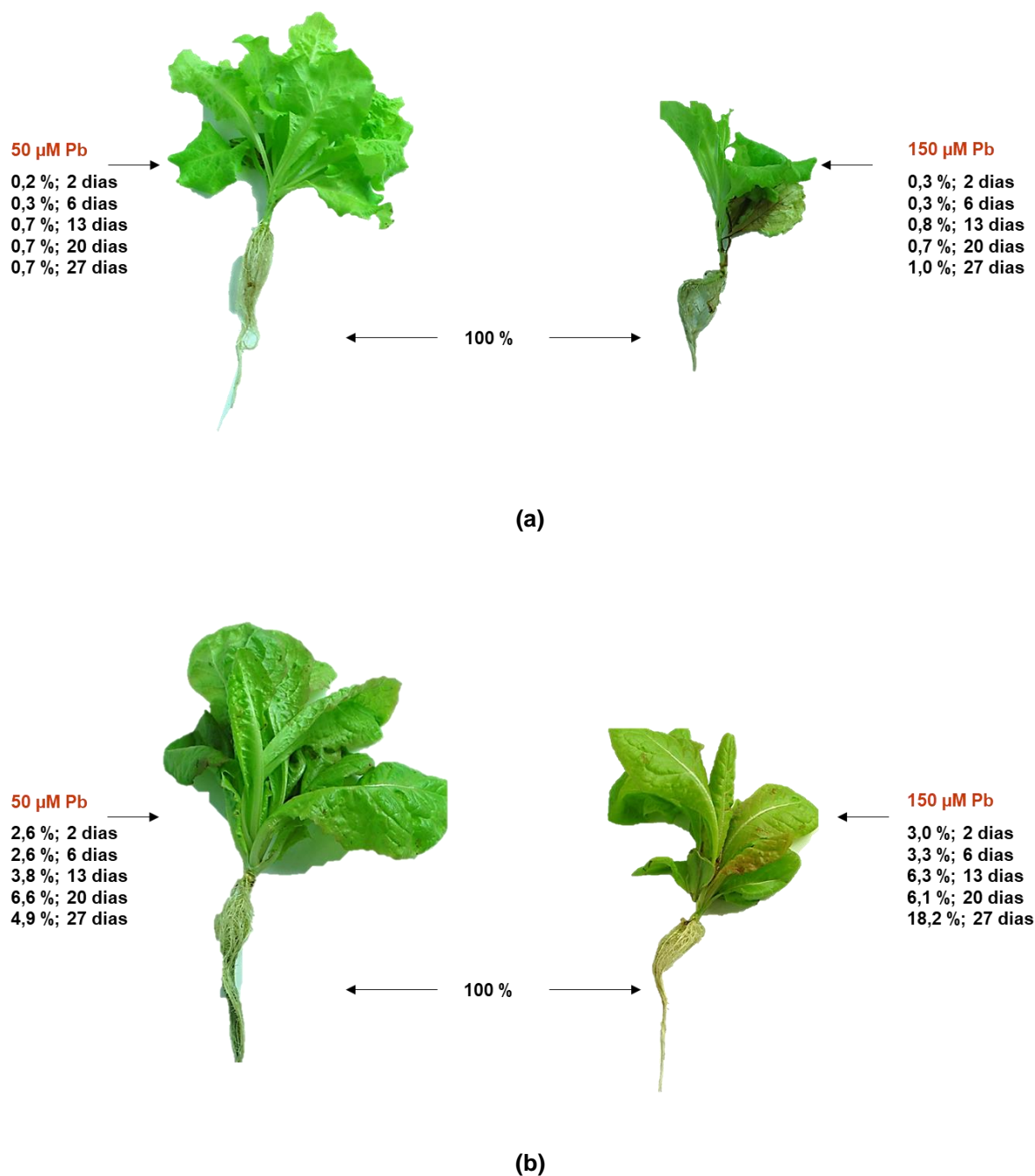
É possível verificar que a cultivar DP absorve uma quantidade muito baixa deste elemento e que não existem grandes variações percentuais quer seja aplicada uma concentração menor ou maior de Pb (50  $\mu\text{M}$ : 0,2-0,7 %; 150  $\mu\text{M}$ : 0,3-1,0 %). Isto evidencia que a translocação deste elemento para a parte aérea é muito baixa.

Na alface M4E há uma transferência superior de Pb para a parte aérea (50  $\mu\text{M}$ : 2,6-6,6 %; 150  $\mu\text{M}$ : 3,0-18,2 %), por comparação com a cultivar DP. Na cultivar M4E, também não existem grandes variações nas percentagens de Pb que são translocadas para a parte aérea, ao longo do tempo, tanto para a contaminação com 50 ou 150  $\mu\text{M}$  de Pb, à exceção dos 27 dias. Ao fim deste período de exposição, a quantidade de Pb que é translocada para a parte aérea da planta é superior em plantas contaminadas com 150  $\mu\text{M}$ . Através dos resultados obtidos é possível verificar que a alface M4E acumula uma menor quantidade de Pb tanto na parte aérea como na raiz, embora esta cultivar apresente uma maior capacidade de translocação de Pb para a parte superior da planta.

#### *Conclusões intercalares*

Não se observam sintomas visíveis de toxicidade muito intensos, apenas se verifica o aparecimento de cloroses e necroses ligeiras em folhas adultas de plantas expostas durante mais tempo ao contaminante (150  $\mu\text{M}$  Pb, 27 dias).

A massa fresca das plantas contaminadas apresenta uma tendência para aumentar ao longo do tempo o que reflete o crescimento normal da planta, ao contrário do que seria de esperar. Aliás observa-se uma estimulação do crescimento da parte aérea (DP: 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  Pb) e raiz (DP: 50 e 75  $\mu\text{M}$  Pb; M4E: 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  Pb), ao fim de 27 dias. Nas duas cultivares é possível observar que a raiz demonstra ser muito pouco afetada, em termos de biomassa, em relação à parte aérea.



**Figura 4.33** – Percentagens de Pb na parte aérea de plantas de alface DP (a) e M4E (b) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 50 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb ao longo do tempo de exposição ao contaminante ( $n=3$ ). Na figura está representado o registo fotográfico obtido ao fim de 27 dias de exposição ao contaminante.



É possível verificar que um aumento de Pb em solução nutritiva apenas afeta os parâmetros vegetativos para tempos e concentrações de Pb mais elevados. Na alface DP ocorre uma diminuição da massa fresca da parte aérea e raiz (150  $\mu\text{M}$  Pb, 13, 20 e 27 dias), enquanto na alface M4E essa diminuição ocorre apenas na parte aérea (100  $\mu\text{M}$  Pb, 27 dias; 125  $\mu\text{M}$  Pb, 27 dias; 150  $\mu\text{M}$  Pb, 6, 13, 20, 27 dias). A presença de Pb interfere com a absorção de água pela planta, podendo ser a causa da diminuição da biomassa observada.

Em ambas as cultivares verifica-se a acumulação preferencial de Pb nas raízes relativamente à parte aérea e estas diferenças traduzem-se num comportamento de acumulação de chumbo completamente diferente em cada um dos órgãos da planta. É esta acumulação preferencial na raiz que limita a sua translocação para a parte aérea, onde os valores são bastante mais baixos.

A acumulação de Pb na parte aérea das duas cultivares de alface apresenta um ajuste razoável ao modelo linear. Este comportamento linear reflete que há uma acumulação proporcional de Pb na parte aérea das plantas à medida que a concentração de Pb disponível no meio contaminado aumenta. Na raiz, os parâmetros obtidos indicam que as duas cultivares de alface têm o mesmo comportamento hiperbólico na acumulação de Pb pela raiz. Os resultados indicam que, quando existe um maior tempo de exposição ao Pb há uma maior acumulação deste elemento na raiz, sendo este comportamento evidente na cultivar DP.

Os valores percentuais obtidos que caracterizam a translocação de Pb para a parte aérea são baixos para ambas as cultivares. A alface M4E apresenta uma maior capacidade de translocação de Pb para a parte superior da planta, embora esta cultivar acumule uma menor quantidade de Pb tanto na parte aérea como na raiz.

Através dos resultados é possível confirmar que existem diferenças entre as cultivares. A alface DP é mais afetada pela presença de Pb, nomeadamente nas percentagens de diminuição da biomassa calculadas, nos resultados obtidos nas percentagens de humidade, interferindo com a absorção de água pela planta, e apresenta uma maior acumulação de Pb nos seus diferentes órgãos.



#### 4.4.4. Cobre

##### 4.4.4.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade de induzidos pelo Cu

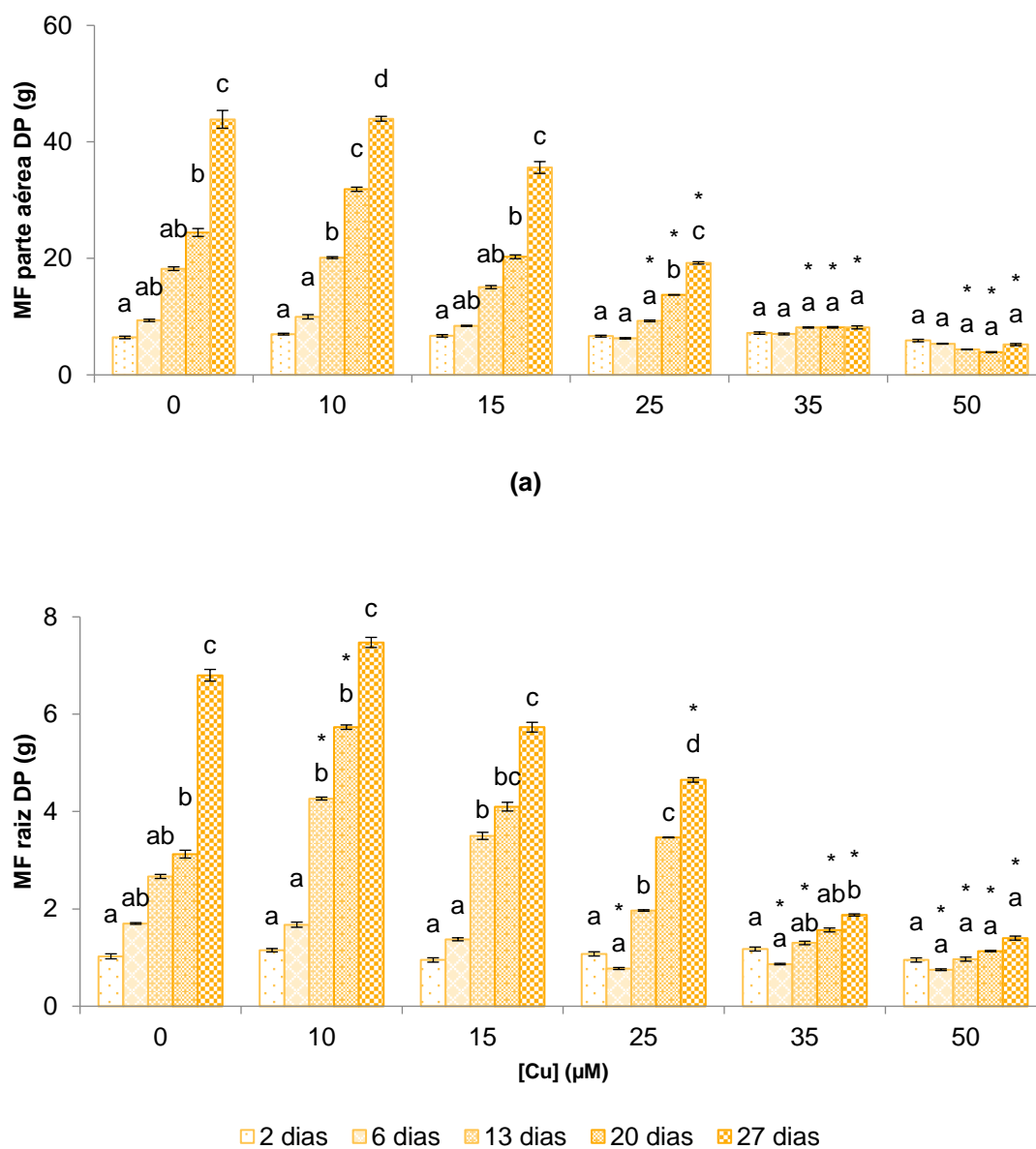
Nas **Figuras 4.34** e **4.35** apresentam-se os resultados obtidos para a massa fresca da parte aérea e da raiz, em alface DP e M4E, respetivamente. Os sintomas visíveis de toxicidade observados para cada cultivar exposta às diferentes concentrações de Cu encontram-se na **Figura 4.36**.

A massa fresca das plantas controlo aumenta ao longo do tempo o que reflete o crescimento normal da planta. É possível verificar que um aumento de Cu em solução afeta o crescimento da planta de alface, levando à diminuição da biomassa da parte aérea e da raiz, sendo este efeito notório para as duas cultivares. Na alface DP existe uma diminuição significativa da massa fresca da parte aérea com exposições a 25, 35 e 50  $\mu\text{M}$  de Cu durante os tempos mais longos (13, 20 e 27 dias) (**Figura 4.34-a**).

Na biomassa da raiz existe um estímulo significativo do crescimento, ao fim de 13 e 20 dias de exposição a 10  $\mu\text{M}$  de Cu, o que se justifica pelo facto do Cu ser um elemento essencial para o crescimento das plantas e, provavelmente, as concentrações não serem suficientemente elevadas para provocar efeitos de toxicidade. As concentrações mais elevadas (35 e 50  $\mu\text{M}$ ) têm um efeito tóxico notório no crescimento da raiz a partir dos 6 dias de exposição a Cu, levando a uma diminuição significativa do seu crescimento comparativamente ao controlo. Este comportamento ocorre porque a raiz é o órgão que está diretamente em contacto com o contaminante o que potencia o seu efeito neste órgão (**Figura 4.34-b**).

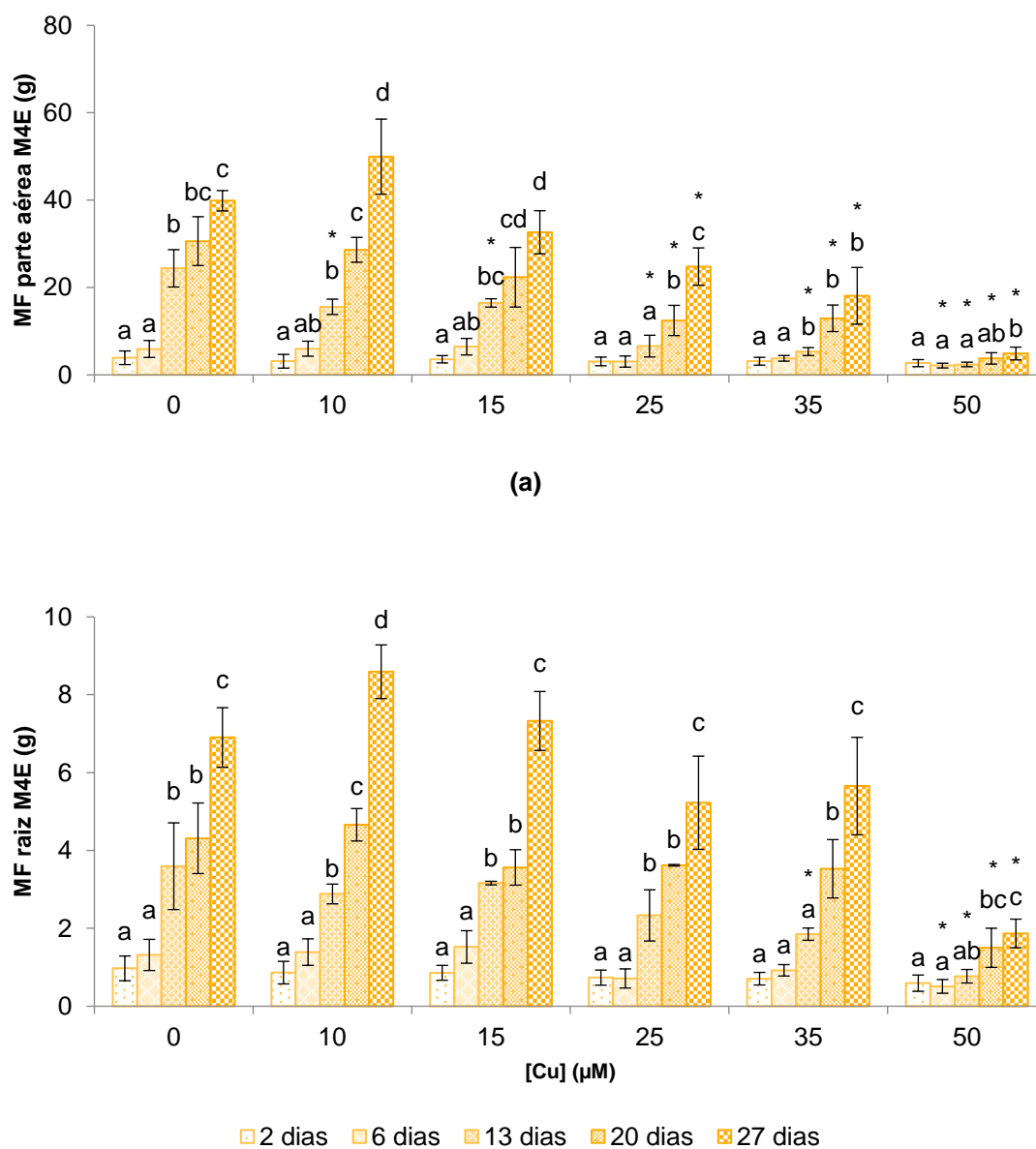
Na alface M4E, também se verifica uma diminuição no crescimento da parte aérea, comparativamente ao controlo, que é mais evidente na exposição a 25  $\mu\text{M}$  (13, 20 e 27 dias), 35  $\mu\text{M}$  (13, 20 e 27 dias) e 50  $\mu\text{M}$  de Cu (6, 13, 20 e 27 dias) (**Figura 4.35-a**). A biomassa da raiz apenas é mais afetada para a exposição a 50  $\mu\text{M}$  de Cu durante 13, 20 e 27 dias (**Figura 4.35-b**).

Se se calcular os valores relativos à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controlo, considerando o caso de maior toxicidade (27 dias, 50  $\mu\text{M}$  Cu), é possível verificar que na alface DP há uma diminuição de 88,1 % na parte aérea e de 79,4 % na raiz, relativamente às plantas controlo. Na alface M4E, verifica-se também uma diminuição de 87,7 % e de 72,9 %, para a parte aérea e raiz, respetivamente.



**Figura 4.34** – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 10, 15, 25, 35 e 50 µM de Cu.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada modalidade. O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 4.35** – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 10, 15, 25, 35 e 50 µM de Cu.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada modalidade. O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).





(a)



(b)

**Figura 4.36** – Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface DP (a) e M4E (b) expostas a Cu durante 27 dias.



É possível verificar que a parte aérea é mais afetada em termos de biomassa nas duas cultivares, o que está de acordo com os resultados descritos anteriormente para a biomassa.

A maioria dos estudos refere o efeito negativo de concentrações excessivas para as plantas evidenciando o efeito tóxico do Cu. Em alface de água (*Pistia stratiotes*), Upadhyay e Panda (2009) observaram uma diminuição do crescimento da parte aérea e raiz em plantas expostas a 100  $\mu\text{M}$  de Cu ao fim de 12, 18 e 24 horas. Outros estudos realizados noutras plantas também evidenciaram este comportamento em videira (Cambrollé et al., 2015), *Prunus cerasifera* (Lombardi e Sebastiani, 2005) e milho (Dresler et al., 2014). Em plantas de colza, uma exposição a 50 e 150  $\mu\text{M}$  de Cu levou a uma diminuição da biomassa da parte aérea e da raiz, que foi mais intensa quanto maior o tempo de exposição ao contaminante (Ivanova et al., 2010). Os autores também verificaram que o efeito tóxico de 50 e 150  $\mu\text{M}$  de Cu, só foi comparável com a adição de 1000 e 2500  $\mu\text{M}$  de Zn, evidenciando que o Cu teve um efeito mais tóxico que o Zn, nas condições de ensaio utilizadas.

Esta diminuição na massa fresca pode estar relacionada com o distúrbio no balanço da água, uma vez que o Cu pode afetar a sua absorção (Rucińska-Sobkowiak, 2016), assim como de outros nutrientes essenciais uma vez que se liga a moléculas que também participam no transporte de Fe, Mn, Ni ou Zn. Por esse motivo, calculou-se os valores relativos à diminuição percentual de água da parte aérea e da raiz (50  $\mu\text{M}$  Cu, 27 dias). Na alface DP observa-se que existe uma elevada diminuição acentuada no teor de água das plantas controlo (parte aérea: 80,5 %; raiz: 86,5 %) comparativamente às plantas contaminadas (parte aérea: 51,2 %; raiz: 50,4 %). Na alface M4E, também há uma tendência para a diminuição do teor de água entre as plantas sem contaminante (parte aérea: 94,7 %; raiz: 84,7 %) e contaminadas com 50  $\mu\text{M}$  de Cu (parte aérea: 70,7 %; raiz: 71,4 %), mas que não é tao acentuada como a verificada na alface DP.

A diminuição da biomassa das plantas também é observada visualmente (**Figura 4.36**). As plantas contaminadas com concentrações mais elevadas de Cu são as que apresentam um tamanho da parte aérea e raiz menor, as folhas apresentam também uma dimensão mais reduzida e as raízes apresentam mais ramificações e um gradual escurecimento. Esta alteração na morfologia da raiz pode ser justificada como referido para as plantas contaminadas com Cd em 4.4.1.1.

No caso da alface DP, as plantas expostas a 50  $\mu\text{M}$  de Cu apresentam folhas com tonalidade verde mais intensa, provavelmente porque a clorofila fica mais concentrada uma vez que a



dimensão da folha contaminada é menor que a controlo (**Figura 4.36-a**). Na alface M4E, existe o aparecimento de uma coloração avermelhada nas folhas jovens (**Figura 4.36-b**).

Normalmente, os principais sintomas visíveis de toxicidade relacionadas com a presença de Cu, incluem um crescimento mais lento da planta mas também alterações na morfologia da raiz (Feigl et al., 2013). Llorens et al. (2000) também observaram um crescimento mais lento e uma inibição do desenvolvimento das raízes laterais em plantas de *Vitis vinífera*. Em couve-flor, a exposição a 0,5 mM de Cu induziu uma diminuição no crescimento da planta e o aparecimento de cloroses em folhas (Chatterjee e Chatterjee, 2000). A presença de 100  $\mu\text{M}$  de Cu originou a presença de sintomas visíveis de toxicidade em plantas de feijão, após 4 dias de exposição, nomeadamente o aparecimento de lesões necróticas nas folhas, diminuição do crescimento da raiz e danos evidentes neste órgão (Yurekli e Porgali, 2006).

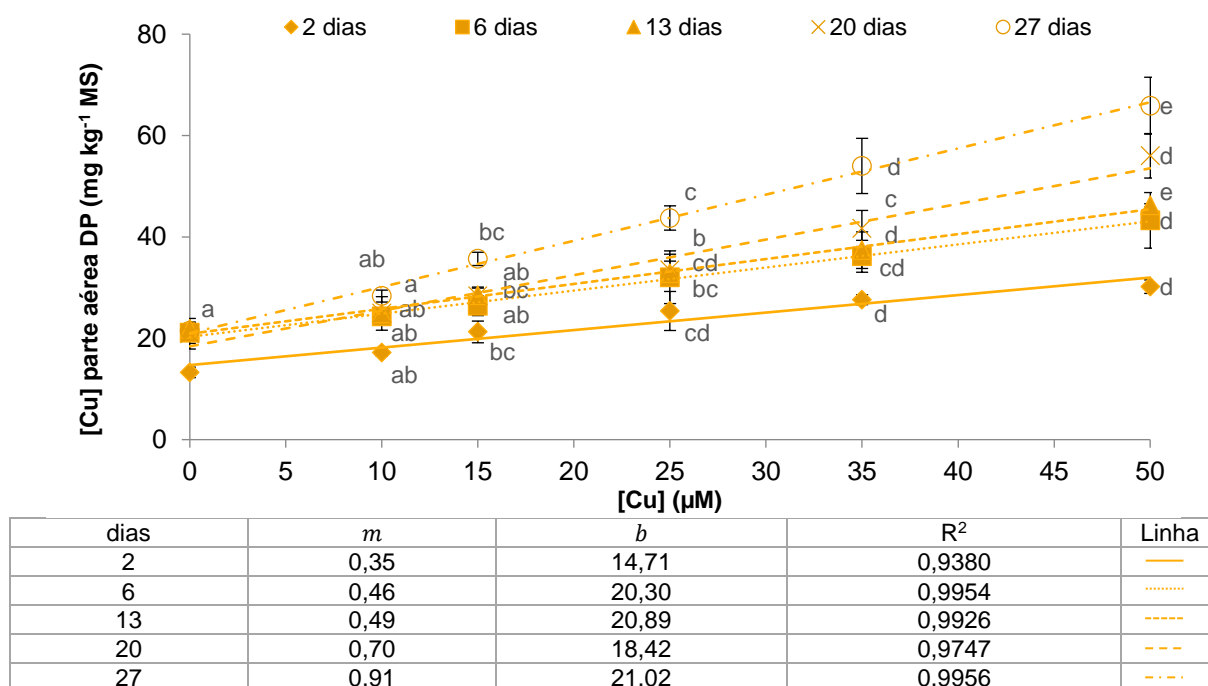
#### 4.4.4.2. Caracterização da acumulação de Cu

Nas **Figuras 4.37, 4.38, 4.39 e 4.40** apresentam-se os resultados obtidos para as concentrações de Cu acumuladas em folha e raiz em função das diferentes concentrações de Cu em solução nutritiva.

A acumulação de Cu por estes dois órgãos apresenta um comportamento linear, o que significa que existe uma proporcionalidade direta entre os valores de Cu absorvidos e os valores de Cu presentes em solução nutritiva. Nestas condições de ensaio, verifica-se que existe um ajuste razoável ao modelo linear, tal como indicam os valores de  $R^2 > 0,86$ .

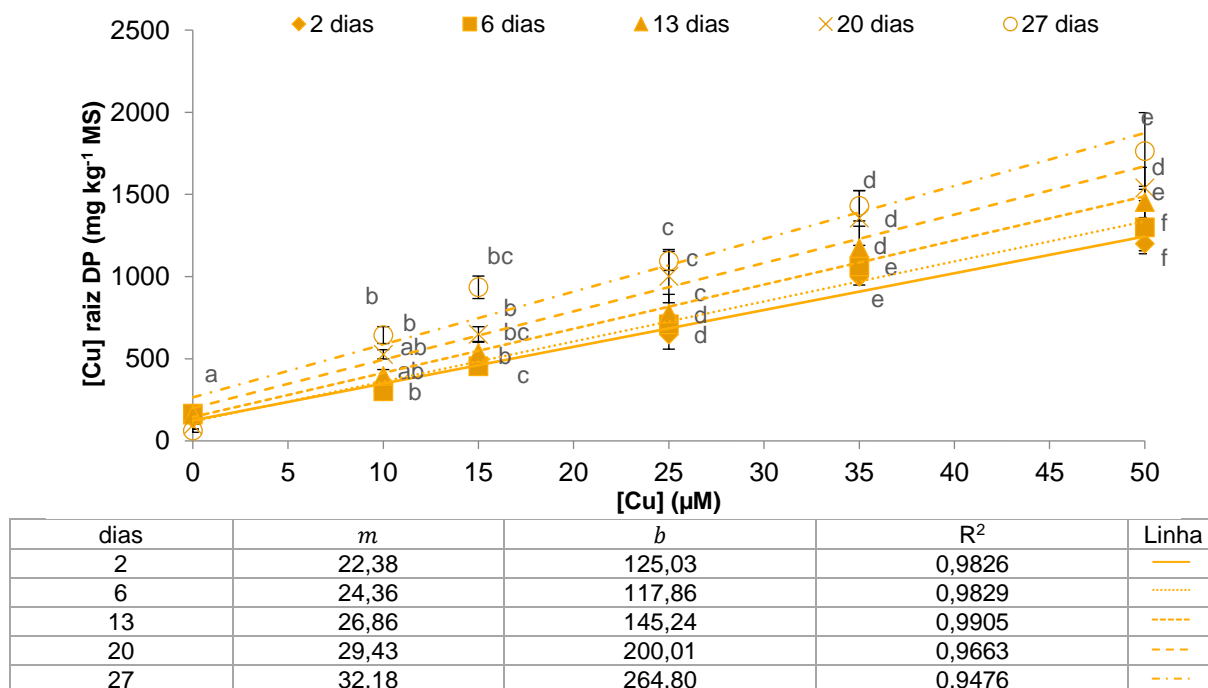
Relativamente às diferenças entre cultivares, os parâmetros obtidos indicam que as duas cultivares de alface demonstram ter o mesmo comportamento linear na acumulação de Cu. De facto, verifica-se que a concentração de Cu na planta tende a aumentar, e nos resultados obtidos foram encontradas diferenças significativas entre plantas expostas a 35 e 50  $\mu\text{M}$  de Cu para todos os tempos de exposição, tanto para raiz como na parte aérea, para as duas cultivares de alface.

Nas duas cultivares de alface é possível observar que a acumulação de Cu é bastante superior na raiz por comparação com a concentração na parte aérea da planta. Ao fim de 2 dias de exposição as raízes acumulam  $300,58 \pm 28,67$  mg de Cu  $\text{kg}^{-1}$  MS (DP) e  $265,27 \pm 29,14$  mg de Cu  $\text{kg}^{-1}$  MS (M4E) quando sujeitas a 10  $\mu\text{M}$  de Cu. As folhas acumulam  $17,21 \pm 0,63$  mg de Cu  $\text{kg}^{-1}$  MS (DP) e  $12,34 \pm 0,27$  mg de Cu  $\text{kg}^{-1}$  MS (M4E) quando sujeitas a 10  $\mu\text{M}$  de Cu.



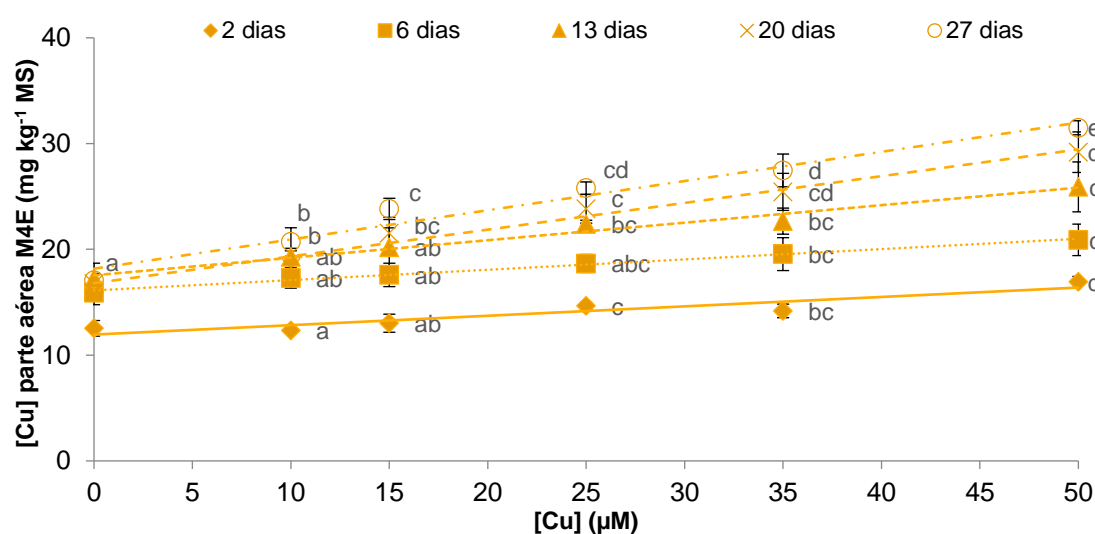
**Figura 4.37** – Concentração de Cu na parte aérea de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 10, 15, 25, 35 e 50  $\mu\text{M}$  de Cu.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 4.38** – Concentração de Cu na raiz de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 10, 15, 25, 35 e 50  $\mu\text{M}$  de Cu.

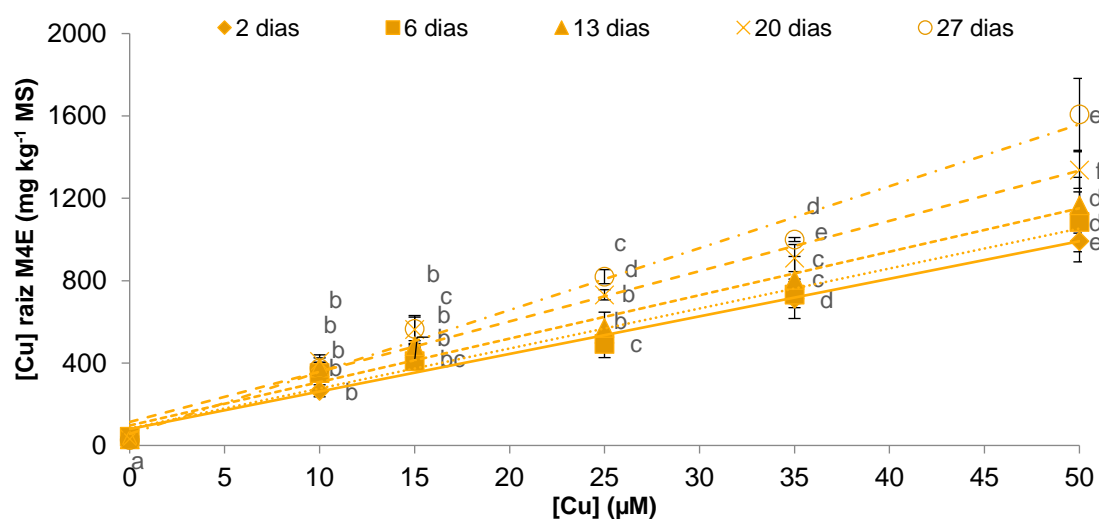
As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



dias	<i>m</i>	<i>b</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	Linha
2	0,09	11,95	0,8683	—
6	0,10	16,12	0,9929	.....
13	0,17	17,55	0,9762	-----
20	0,25	16,81	0,9754	- - - -
27	0,28	18,17	0,9657	- . - .

**Figura 4.39** – Concentração de Cu na parte aérea de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 10, 15, 25, 35 e 50  $\mu\text{M}$  de Cu.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



dias	<i>m</i>	<i>b</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	Linha
2	18,25	79,52	0,9859	—
6	19,42	82,38	0,9746	.....
13	21,10	96,99	0,9756	-----
20	24,41	114,13	0,9802	- - - -
27	30,06	56,17	0,9873	- . - .

**Figura 4.40** – Concentração de Cu na raiz de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 10, 15, 25, 35 e 50  $\mu\text{M}$  de Cu.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



Na planta adulta, as raízes acumulam  $1764,45 \pm 233,43$  mg de Cu  $\text{kg}^{-1}$  MF (DP) e  $1607,70 \pm 174,61$  mg de Cu  $\text{kg}^{-1}$  MF (M4E), quando expostas durante 27 dias, a  $50 \mu\text{M}$  de Cu. As folhas acumulam  $65,90 \pm 5,61$  mg de Cu  $\text{kg}^{-1}$  MF (DP) e  $31,49 \pm 0,66$  mg de Cu  $\text{kg}^{-1}$  MF (M4E), quando expostas durante 27 dias, a  $50 \mu\text{M}$  de Cu.

É possível verificar que não existem grandes variações na quantidade acumulada de Cu pelas duas cultivares, tanto em folha como em raiz, à exceção da quantidade de Cu acumulada na parte aérea da alface M4E que foi menor relativamente à outra cultivar.

Esta acumulação preferencial de Cu nas raízes ocorre porque provavelmente, após ser absorvido pela raiz, o Cu para ser transportado e imobilizado nos vacúolos, liga-se a moléculas orgânicas ou quelatos ou fica adsorvido às paredes celulares, prevenindo a sua translocação para a parte aérea. Em plantas de feijão contaminadas ( $100 \mu\text{M}$  Cu, 10 dias), Yurekli e Porgali (2006) observaram que o Cu foi maioritariamente acumulado na raiz, comparativamente à parte aérea, havendo um aumento muito significativo do seu teor neste órgão.

Na **Figura 4.41** encontram-se representadas as percentagens de Cu que estão presentes na parte aérea das plantas de alface, em relação à quantidade na raiz (100 %), em plantas contaminadas com 10 e  $50 \mu\text{M}$ , sendo possível confirmar o que foi descrito anteriormente.

Vários autores referem que o Cu é dificilmente transportado para a parte aérea das plantas (Chatterjee e Chatterjee, 2000; Gardea-Torresdey et al., 2004; Ivanova et al., 2010). Os resultados obtidos confirmam esta afirmação, dado que as percentagens de Cu presentes na parte aérea são baixas, em relação à raiz, o que demonstra uma menor translocação de Cu para a parte superior da planta. Na alface DP, para todos os tempos de exposição são translocados entre 4,4-8,1 % ( $10 \mu\text{M}$ ) e 2,5-3,7 % ( $50 \mu\text{M}$ ) para a parte aérea. Na alface M4E são translocados entre 4,5-5,5 % ( $10 \mu\text{M}$ ) e 1,7-2,2 % ( $50 \mu\text{M}$ ).

Nas duas cultivares, as percentagens que refletem a translocação para a parte aérea das plantas contaminadas com  $10 \mu\text{M}$  são ligeiramente superiores às obtidas com uma exposição a  $50 \mu\text{M}$  de Cu. Este comportamento pode indicar que há uma baixa translocação para a parte aérea mesmo quando a concentração de Cu no meio é mais elevada, porque o Cu se acumula preferencialmente nas raízes como explicado anteriormente. Para além disso, pode ocorrer a saturação dos transportadores devido à existência de um equilíbrio bem definido entre o interior da planta e o Cu presente no meio, uma vez que o cobre é um elemento essencial para o normal desenvolvimento da planta.





(a)



(b)

**Figura 4.41** – Percentagens de Cu na parte aérea de plantas de alface M4E em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 10 e 50 µM de Cu ao longo do tempo de exposição ao contaminante (n=3). Na figura está representado o registo fotográfico obtido ao fim de 27 dias de exposição ao contaminante.





### *Conclusões intercalares*

A presença de Cu afeta o crescimento da planta de alface, levando à diminuição da biomassa da parte aérea e da raiz, sendo este efeito evidente para as duas cultivares. No caso da alface DP, para além deste efeito existe um ligeiro estímulo do crescimento da raiz nas plantas expostas a concentrações mais baixas de cobre (10  $\mu\text{M}$ , 13 e 20 dias).

Verifica-se que a parte aérea é mais afetada em termos de diminuição percentual da biomassa, relativamente à raiz, nas duas cultivares. Esta diminuição na massa fresca pode estar relacionada com um distúrbio no balanço da água, uma vez que se verifica uma diminuição percentual no teor de água da parte aérea e da raiz nas plantas contaminadas, em relação às plantas controlo. Esta diminuição é mais acentuada para a alface DP.

Visualmente os sintomas observados consistem numa diminuição da dimensão das folhas e as raízes apresentam mais ramificações e um escurecimento gradual. No caso da alface DP, as plantas apresentam folhas com tonalidade verde mais intensa enquanto na alface M4E existe o aparecimento de uma coloração avermelhada nas folhas mais jovens (50  $\mu\text{M}$  Cu).

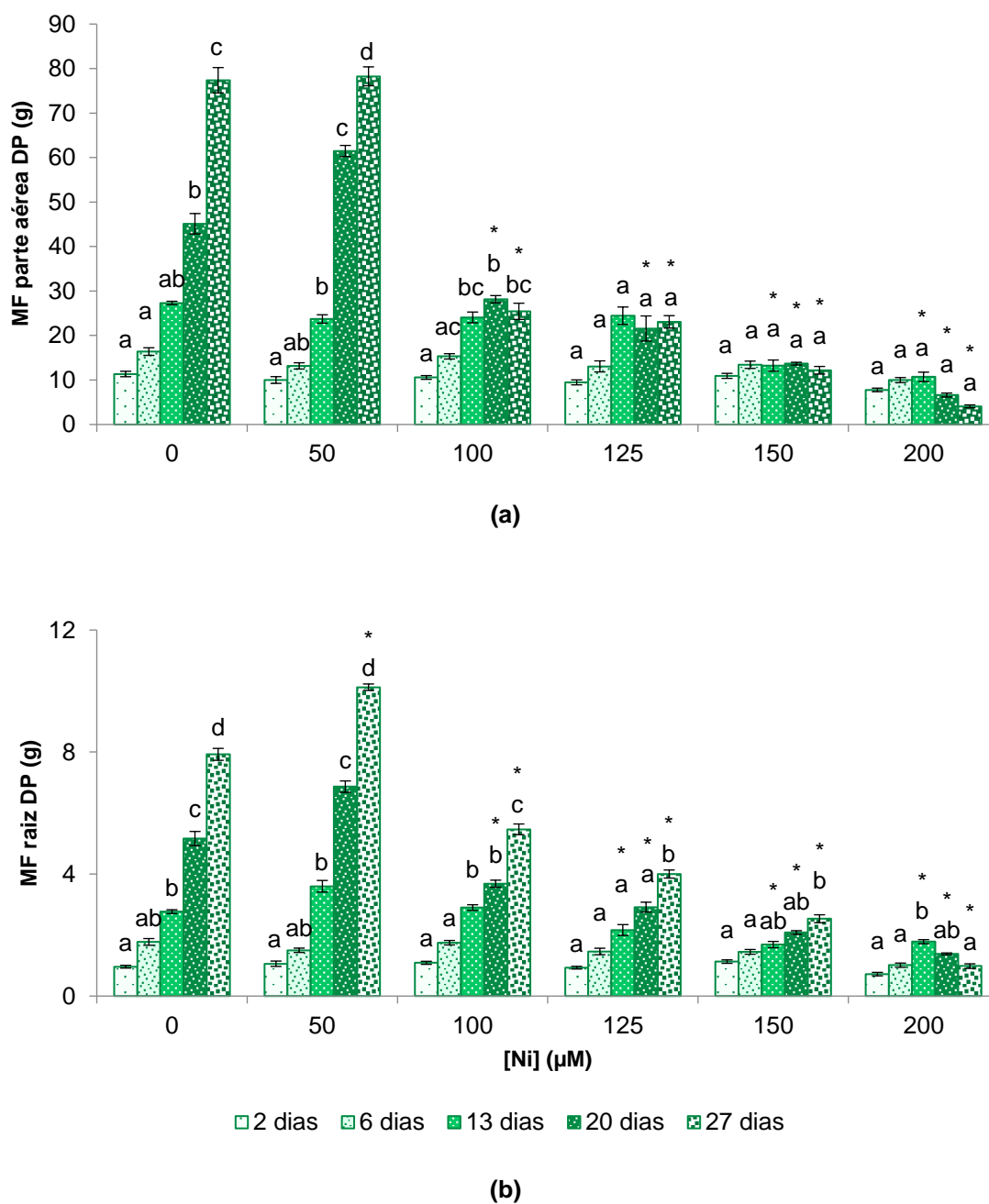
A acumulação de Cu na parte aérea e raiz das duas cultivares de alface apresenta um comportamento linear, o que significa que existe uma proporcionalidade direta entre os valores de Cu absorvidos e os valores de cobre presentes em solução nutritiva. A acumulação deste elemento é superior na raiz, onde a concentração de cobre é mais elevada por comparação com a parte aérea, em ambas as cultivares. Este comportamento está de acordo com a baixa translocação para a parte aérea verificada, que é confirmado pela relação percentual calculada entre raiz e parte aérea.

A cultivar DP tem uma acumulação de cobre maior parte aérea relativamente à outra cultivar M4E.

#### **4.4.5. Níquel**

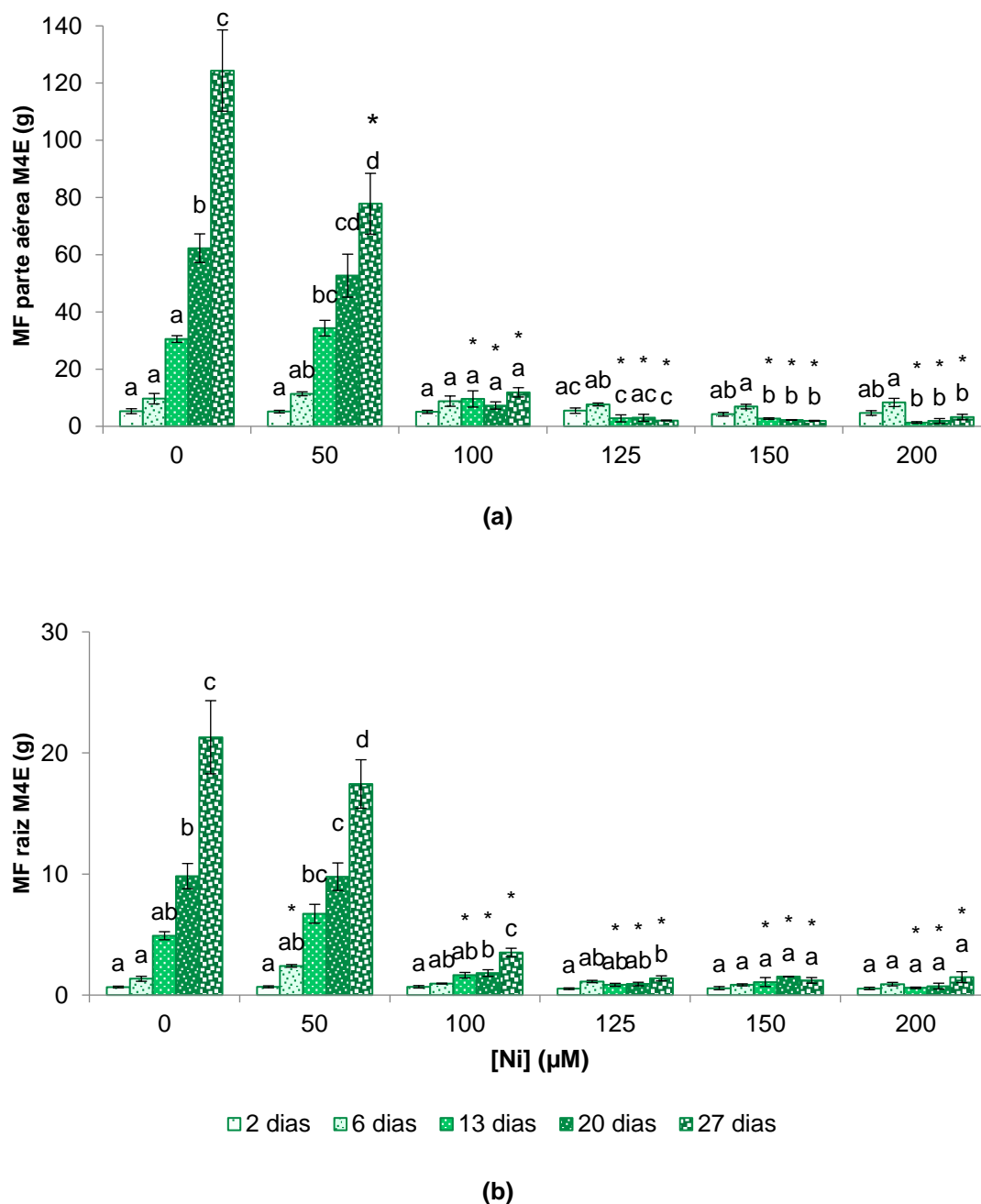
##### **4.4.5.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Ni**

Os resultados obtidos do efeito do Ni na massa fresca da parte aérea (**Figura 4.42**) e da raiz (**Figura 4.43**), bem como se existem sintomas visíveis de toxicidade (**Figura 4.44**) são apresentados nas seguintes figuras.



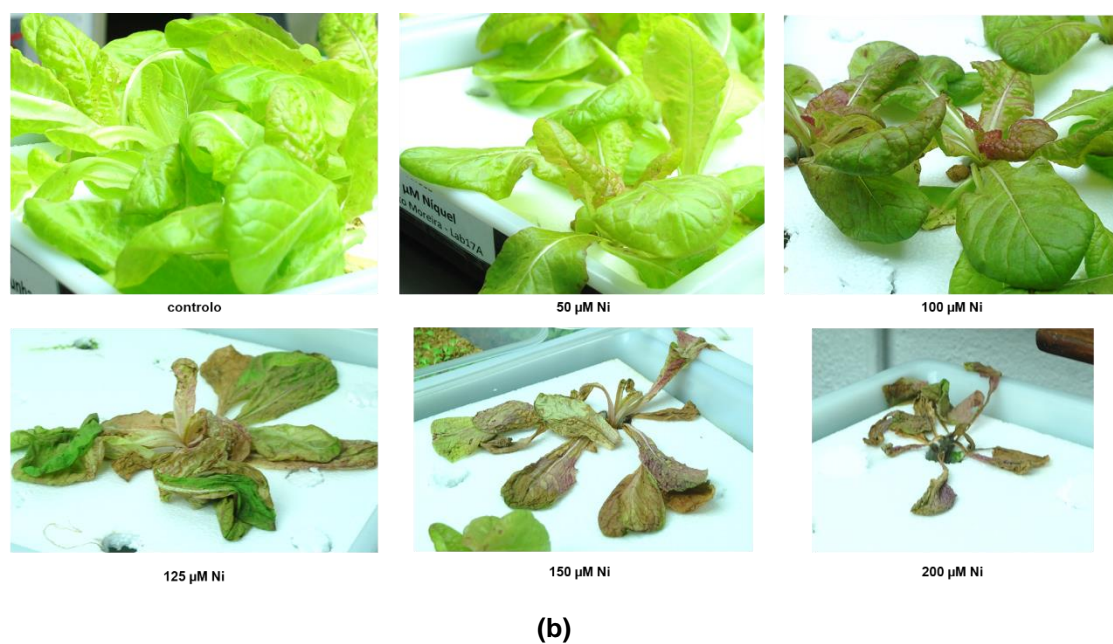
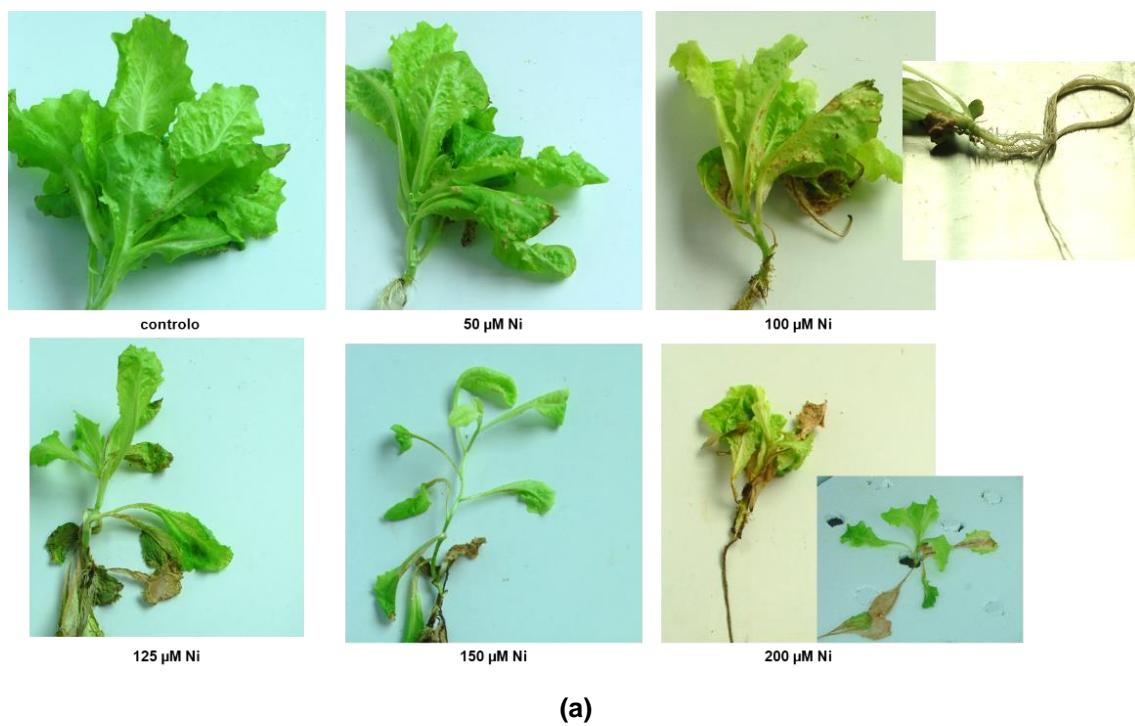
**Figura 4.42** – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 100, 125, 150 e 200 µM de Ni.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada modalidade. O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 4.43** – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 100, 125, 150 e 200 µM de Ni.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada modalidade. O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 4.44** – Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface DP (a) e M4E (b) expostas a Ni durante 27 dias.



Em ambas as cultivares de alface é evidente uma diminuição da massa fresca, tanto da parte aérea como da raiz, com o aumento da concentração de Ni em solução nutritiva.

Na alface DP, esta diminuição é significativa na massa fresca da parte aérea, em relação ao controlo, para plantas contaminadas com 100 e 125  $\mu\text{M}$  de Ni (20 e 27 dias) e 150 e 200  $\mu\text{M}$  de Ni (13, 20 e 27 dias) (**Figura 4.42-a**). Na raiz, existe um estímulo do crescimento com a exposição a 50  $\mu\text{M}$  de Ni, ao fim de 27 dias. Para concentrações superiores, 100  $\mu\text{M}$  de Ni (20 e 27 dias) e 125, 150 e 200  $\mu\text{M}$  de Ni (13, 20 e 27 dias) há uma diminuição na massa fresca da raiz (**Figura 4.42-b**).

Na alface M4E, este decréscimo é bastante significativo, comparativamente às plantas controlo, tanto em relação às raízes (**Figura 4.43-b**) como à parte aérea (**Figura 4.43-a**). Existe uma diminuição significativa em plantas expostas a 50  $\mu\text{M}$  de Ni após 27 dias de exposição e em plantas expostas a 100, 125, 150 e 200  $\mu\text{M}$  de Ni a partir dos 13 dias. Nesta cultivar, este efeito é substancialmente mais evidente, por comparação com a cultivar DP, a partir da contaminação com 50  $\mu\text{M}$ .

Se se calcularem os valores relativos à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz (200  $\mu\text{M}$ , 27 dias), comparativamente ao controlo, é possível observar que não existem grandes diferenças entre cultivares. No caso da alface DP, existe uma diminuição de 94,7 % e de 87,6 % para a parte aérea e raiz, respetivamente. Na alface M4E há uma diminuição de 97,4 % na parte aérea e de 93,0 %, na raiz, respetivamente. Contudo, o efeito na biomassa é semelhante para ambas as cultivares.

No entanto, através da observação dos gráficos é possível verificar que é a cultivar M4E que é mais afetada em termos de biomassa, calculando-se os valores relativos à diminuição percentual da biomassa, mas para uma exposição a 125  $\mu\text{M}$  ao fim de 27 dias, é possível confirmar este efeito. Na alface M4E há uma diminuição de 98,4 % (parte aérea) e de 93,5 % (raiz), enquanto na alface DP esta diminuição não é tão acentuada, tal como evidenciam as percentagens para a parte aérea (70,2 %) e raiz (49,5 %).

Resultados semelhantes foram obtidos por Iori et al. (2013) que demonstraram que ocorreu uma diminuição gradual na biomassa das plantas de *Amaranthus* com o aumento da concentração de Ni em solução (50, 100, 150  $\mu\text{M}$ , 7 dias). Os autores referiram que as raízes demonstraram uma sensibilidade a concentrações de Ni inferiores a 25  $\mu\text{M}$ , enquanto as folhas apresentaram uma capacidade de tolerar a presença de Ni até 100  $\mu\text{M}$ . Com a exposição a 150  $\mu\text{M}$  a biomassa foi muito afetada, tanto em raiz como em folhas. A biomassa de folhas de trigo diminuiu significativamente com a exposição a 100  $\mu\text{M}$  de Ni, ao fim de 3



(26 %) e 9 dias (39 %), comparativamente às plantas controlo (Gajewska e Skłodowska, 2007). Num estudo semelhante, Gajewska e Skłodowska (2008) referiram que a exposição a 100 e 200  $\mu\text{M}$  de Ni, provocou a diminuição do crescimento da raiz de trigo em 37 e 53 %, respetivamente. Outros autores também têm observado que a presença de concentrações crescentes de Ni em solução nutritiva origina a diminuição do crescimento de *Cajanus cajan* (Rao e Sresty, 2000), cevada (Kumar et al., 2012), tomate (Kumar et al., 2015) e noutras plantas (Seregin e Kozhevnikova, 2006).

É interessante verificar que Gajewska et al. (2006) também observaram um estímulo do crescimento de plantas trigo. Os autores referiram que a exposição a baixas concentrações de Ni (10  $\mu\text{M}$ , 9 dias) ocorreu um ligeiro aumento da biomassa da parte aérea, não afetando os parâmetros de crescimento nem resultando no aparecimento de sintomas visíveis de toxicidade.

No presente trabalho calculou-se os valores médios das percentagens de humidade para a biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente às plantas controlo (200  $\mu\text{M}$ , 27 dias). Na alface DP verifica-se que existe uma diminuição no teor de água das plantas controlo (parte aérea: 89,3 %; raiz: 91,4 %) em relação às plantas contaminadas (parte aérea: 41,7 %; raiz: 80,0 %). Na alface M4E observa-se que também há tendência para a redução no teor de água das plantas controlo (parte aérea: 87,7 %; raiz: 90,9 %) em relação às plantas contaminadas (parte aérea: 10,2 % e raiz: 88,9 %). Em ambas as cultivares é evidente que a parte aérea é muito mais afetada em termos de diminuição do teor de água que a raiz, apresentando a cultivar M4E uma redução bastante notória. É possível afirmar que o Ni interfere com a absorção de água pela planta e que esta diminuição no teor de água em plantas contaminadas com Ni tem como consequência uma diminuição na biomassa.

Alguns estudos também observaram este comportamento. De acordo com Bashmakov et al. (2006) plantas de milho, expostas a 10  $\mu\text{M}$ , apresentaram uma diminuição na massa fresca. Para além disso, um aumento na concentração de Ni aplicada (50 a 100  $\mu\text{M}$ ) levou a uma diminuição linear da biomassa fresca da parte aérea e da raiz, bem como o teor de água, o que poderá ser o fator responsável pela diminuição da massa fresca das plantas. Gajewska et al. (2006) referiram para concentrações mais elevadas de Ni (200  $\mu\text{M}$ ) ocorreu uma inibição considerável do crescimento da parte aérea que foi evidenciado através da diminuição da massa fresca e do comprimento da parte aérea. Os autores observaram que esta diminuição na biomassa resultou da diminuição do teor de água na planta.





Para ambas as cultivares é evidente o efeito tóxico do Ni, observando-se uma diminuição gradual do tamanho da planta, uma diminuição do tamanho das folhas, aparecimento de folhas murchas, folhas cloróticas e necroses nas concentrações mais elevadas aplicadas (**Figura 4.44a e 4.44b**). Em ambas as cultivares, as plantas contaminadas com 200  $\mu\text{M}$  de Ni são muito afetadas em relação às plantas controlo. As raízes das plantas contaminadas, com o aumento da concentração de Ni, diminuem de tamanho, apresentam ramificações laterais de menores dimensões e ficam negras. Esta alteração na morfologia da raiz pode ser justificada como referido para as plantas contaminadas com Cd em **4.4.1.1**.

Tal como referido, a diminuição do tamanho da planta verificada pode estar relacionada com a alteração do balanço hídrico, pois o Ni pode levar a absorção deficiente de água sendo isso também verificado pelo aparecimento de folhas murchas.

A planta de alface poderá ser uma boa bioindicadora dos níveis de Ni presentes, uma vez que manifesta claramente os seus efeitos adversos. Vários autores também observaram que um excesso de Ni no meio de crescimento de diferentes plantas, provocou diversos sintomas visíveis de toxicidade, tais como o acastanhamento e a inibição do crescimento da raiz e o aparecimento de cloroses e necroses em folhas (Alam et al., 2007; Gajewska e Skłodowska, 2007; Gajewska et al., 2006; Iori et al., 2013; Kumar et al., 2012; Pesko e Kral'ova, 2012). Num estudo realizado com alface observou-se uma inibição do crescimento da raiz e as folhas ficaram mais pequenas e com uma tonalidade mais clara comparativamente ao controlo (Liu et al., 2014). As plantas de *Pistia stratiotes* expostas a elevadas concentrações de Ni (170-1700  $\mu\text{M}$ , 6 dias), evidenciaram sintomas visíveis de toxicidade como a perda de vigor das plantas devido ao aparecimento de folhas murchas, cloroses nas folhas jovens, raízes quebradiças e o seu acastanhamento. Pandey e Sharma (2002) também observaram o aparecimento de cloroses, manchas negras nas margens das folhas de couve e uma diminuição no potencial hídrico, resultando no aparecimento de folhas murchas, tal como ocorreu para as plantas de alface neste estudo. As plantas de cevada, contaminadas com 100  $\mu\text{M}$  de Ni, evidenciaram sintomas visíveis de toxicidade como cloroses nas folhas jovens e necroses nas folhas adultas, e o acastanhamento das raízes, enquanto plantas contaminadas com 1 e 10  $\mu\text{M}$  de Ni não apresentaram esses sintomas (Rahman et al., 2005). Estes resultados também estão de acordo com os obtidos para as duas cultivares de alface onde as plantas que cresceram na presença de concentrações mais baixas de Ni não apresentaram sintomas visíveis de toxicidade. Yusuf et al. (2011) referem que o crescimento das folhas pode servir como um bioindicador para avaliação da contaminação causada pela presença de metais pesados e na seleção de espécies resistentes, pelo que estes resultados indicam que pode ser aplicado ao efeito do Ni.





#### 4.4.5.2. Caracterização da acumulação de Ni

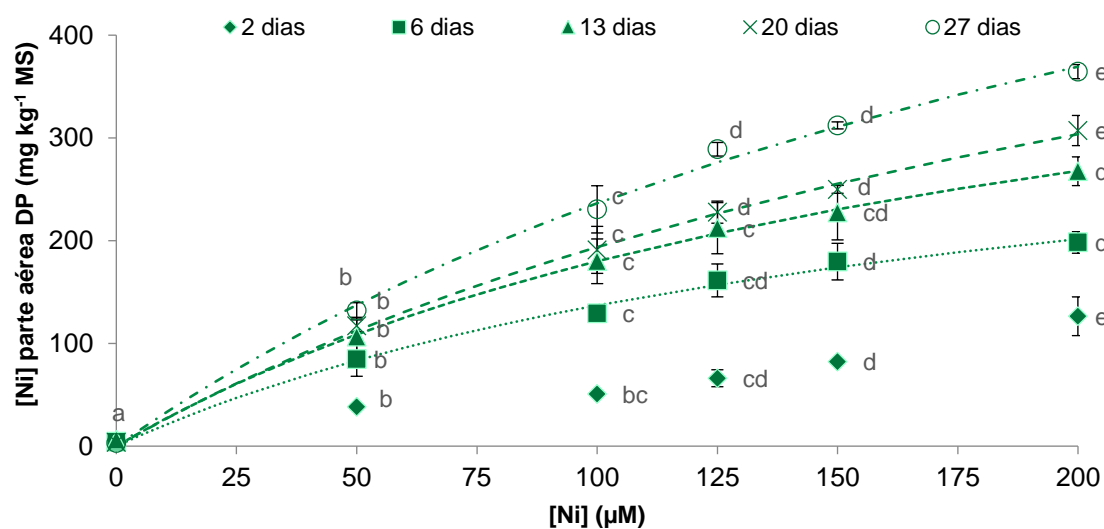
A acumulação de Ni está representada para a alface DP nas **Figuras 4.45 e 4.46** e para a alface M4E nas **Figuras 4.47 e 4.48**. Para caracterização da acumulação do Ni em função da concentração de Ni em solução nutritiva foram ajustadas curvas hiperbólicas, como é definido em (4.3.5.2.). As curvas ajustadas estão representadas pelas linhas das **Figuras 4.45-4.48**, assim como os parâmetros do modelo utilizado.

Nas condições do ensaio, verifica-se que existe um ajuste razoável ao modelo hiperbólico, tal como indicam os valores de  $R^2 > 0,93$ . Apesar de não se terem atingindo valores de saturação pode-se considerar que a utilização deste modelo hiperbólico é adequada dado que, em solução nutritiva a disponibilidade de Ni é praticamente completa.

Com o aumento do tempo de exposição existe uma maior acumulação de Ni nas plantas, que se reflete no aumento dos valores de  $C_{\text{máx}}$  obtidos. Este comportamento acontece tanto para a parte aérea como para a raiz, e para as duas cultivares de alface. O  $K_{\text{Ni}}$  caracteriza o processo de acumulação de Ni e verifica-se que para todos os tempos de exposição o mecanismo de acumulação é semelhante e descrito pelo mesmo tipo de curva ajustada.

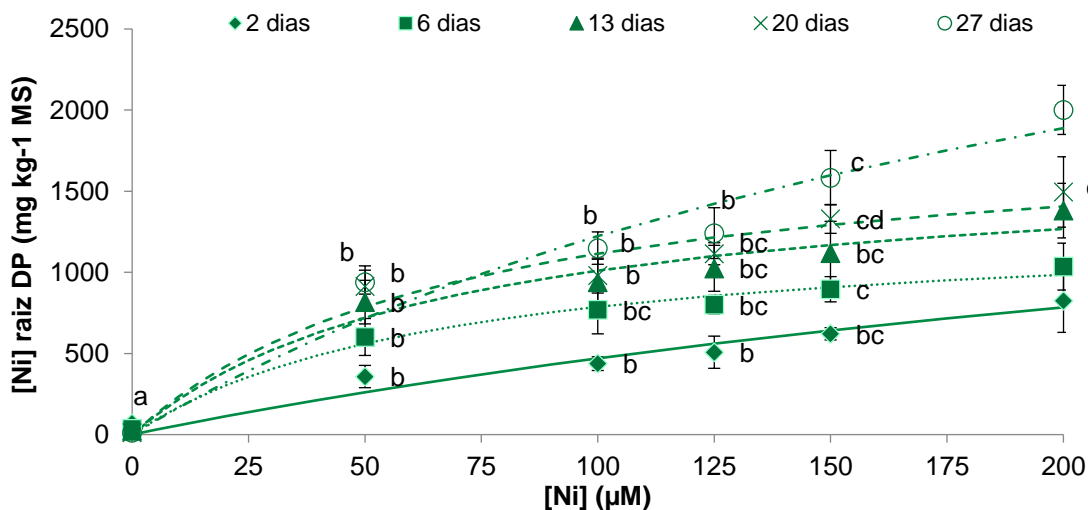
Verifica-se que ambas as cultivares de alface demonstram ter o mesmo comportamento hiperbólico na acumulação de Ni, ou seja, à medida que a concentração de Ni em solução nutritiva aumenta, há uma tendência para acumular uma maior quantidade de Ni nas diferentes partes da planta, existindo uma tendência para a estabilização dos valores máximos.

Ao fim de 2 dias de exposição quando submetidas a 50  $\mu\text{M}$  de Ni, as raízes acumulam  $357,93 \pm 68,72$  mg de Ni  $\text{kg}^{-1}$  MS (DP) e  $278,69 \pm 33,04$  mg de Ni  $\text{kg}^{-1}$  MS (M4E). As folhas acumulam uma quantidade menor,  $38,28 \pm 1,70$  mg de Ni  $\text{kg}^{-1}$  MS (DP) e  $54,99 \pm 6,54$  mg de Ni  $\text{kg}^{-1}$  MS (M4E). Na planta adulta (27 dias) exposta a 200  $\mu\text{M}$  de Ni, as raízes acumulam uma quantidade elevada de  $2001,39 \pm 151,32$  mg de Ni  $\text{kg}^{-1}$  MF (DP) e  $2677,76 \pm 269,88$  mg de Ni  $\text{kg}^{-1}$  MF (M4E). As folhas acumulam  $364,52 \pm 6,86$  mg de Ni  $\text{kg}^{-1}$  MF (DP) e  $529,88 \pm 16,59$  mg de Ni  $\text{kg}^{-1}$  MF (M4E). A alface M4E apresenta uma maior acumulação de Ni na parte aérea, relativamente, à cultivar DP. Na raiz não se observam grandes variações nas quantidades de Ni acumuladas por cada uma das cultivares.



dias	$C_{\text{máx}}$	$K_{\text{Ni}}$	$R^2$	Linha
2 <sup>2</sup>	-	-	-	-
6	381,3	178,4	0,9947	.....
13	524,7	191,7	0,9984	-----
20	702,1	262,4	0,9985	----
27	844,4	257,2	0,9971	-.-.-.

**Figura 4.45** – Concentração de Ni na parte aérea de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 100, 125, 150 e 200  $\mu\text{M}$  de Ni. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).

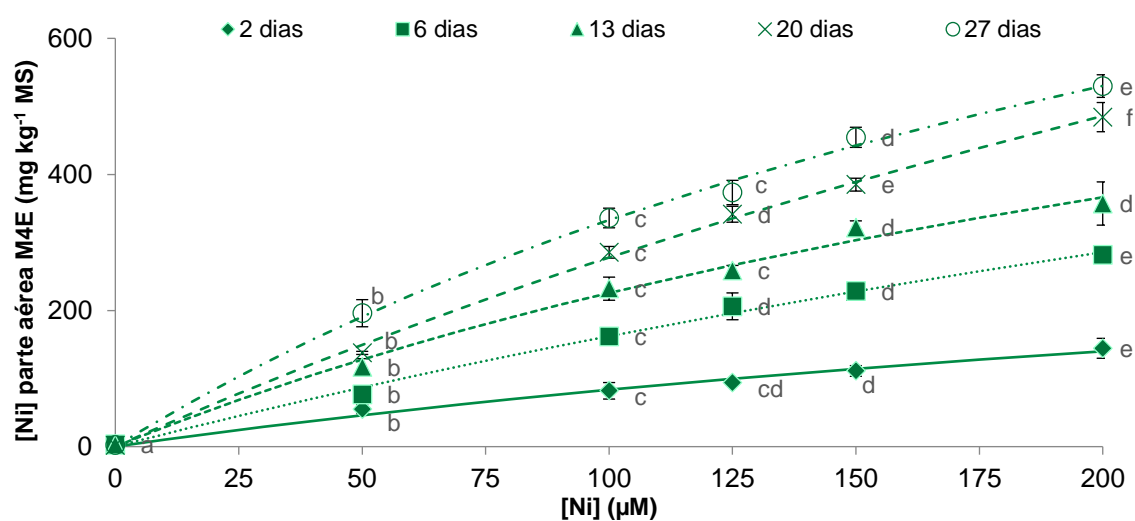


dias	$C_{\text{máx}}$	$K_{\text{Ni}}$	$R^2$	Linha
2	2366,7	403,4	0,9373	—
6	1317,7	67,5	0,9853	.....
13	1697,7	67,9	0,9665	-----
20	1907,6	71,2	0,9604	----
27	4147,3	239,2	0,9553	-.-.-.

**Figura 4.46** – Concentração de Ni na raiz de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 100, 125, 150 e 200  $\mu\text{M}$  de Ni.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).

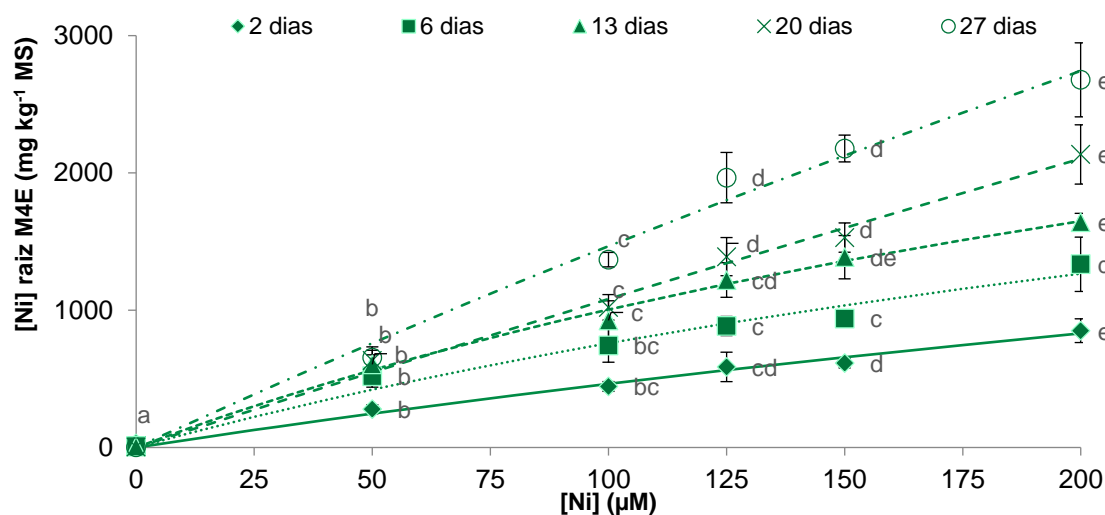
<sup>2</sup> Não se conseguiu efetuar o ajuste ao modelo utilizado para os restantes tempos.



dias	$C_{m\acute{a}x}$	$K_{Ni}$	$R^2$	Linha
2	434,7	420,6	0,9869	—
6	1195,8	636,8	0,9956	.....
13	968,0	328,3	0,9927	----
20	1929,6	594,1	0,9983	----
27	1297,9	289,6	0,9973	----

**Figura 4.47** – Concentração de Ni na parte aérea de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 100, 125, 150 e 200 µM de Ni.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



dias	$C_{m\acute{a}x}$	$K_{Ni}$	$R^2$	Linha
2	4002,0	762,6	0,9876	—
6	3825,5	404,3	0,9754	.....
13	4587,3	356,4	0,9944	----
20	39432,1	3548,6	0,9931	----
27	21090,7	1337,8	0,9892	----

**Figura 4.48** – Concentração de Ni na raiz de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 100, 125, 150 e 200 µM de Ni.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



Este comportamento hiperbólico parece indicar que as plantas de alface são plantas acumuladoras de Ni. De acordo com Prasad (2004) as plantas designadas por tolerantes acumulam quantidades elevadas de EPT até na presença de baixas concentrações na solução nutritiva, e possuem mecanismos de destoxificação, que lhes permitem tolerar os seus efeitos tóxicos.

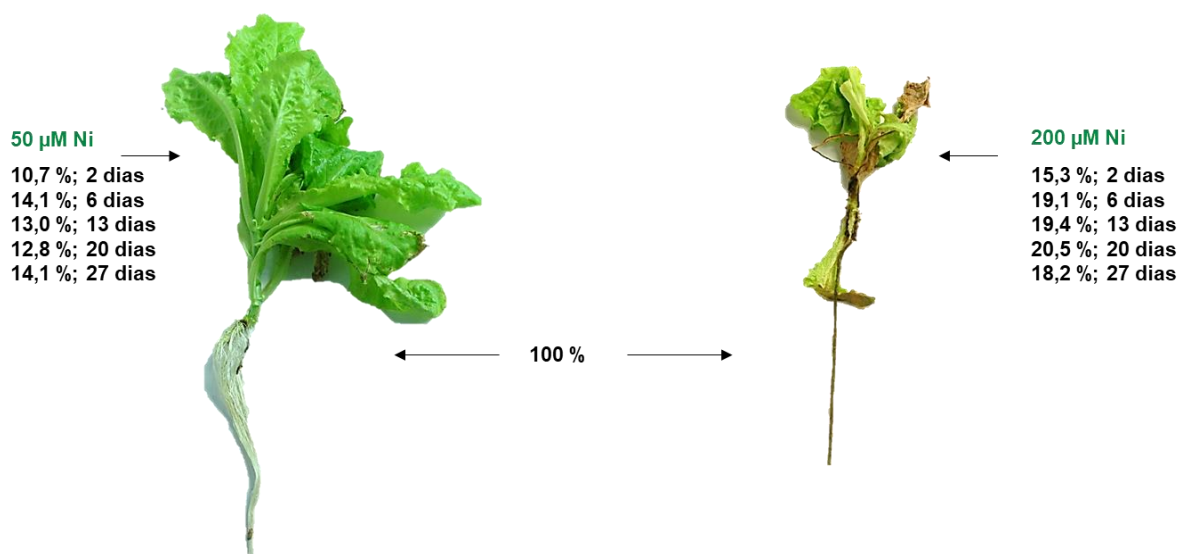
Esta acumulação de Ni nos tecidos da planta com o aumento da concentração disponível no meio também tem sido verificada por outros autores (Gajewska et al., 2012; Gajewska e Skłodowska, 2010; Gajewska e Skłodowska, 2007; Gajewska et al., 2006; Rao e Sresty, 2000). Em plantas de colza (Pesko e Kral'ova, 2012) os autores verificaram que a acumulação de Ni na planta para níveis de Ni no meio entre 0-120  $\mu\text{M}$ , apresentou um comportamento linear, tanto em raízes como na parte aérea. Iori et al. (2013) verificaram que o teor de Ni em folhas e raízes aumenta após a exposição a concentrações crescentes de 25, 50, 100 e 150  $\mu\text{M}$  em solução nutritiva, sendo essa acumulação muito significativa para as concentrações mais elevadas.

Nas duas cultivares de alface estudadas, as raízes acumulam uma maior quantidade de Ni. Isto pode ocorrer porque este elemento é essencial para a planta e, por isso, não existem tantas barreiras à sua entrada e, para além disso, este órgão é o primeiro a estar em contacto com contaminante. Este comportamento também pode ser confirmado através da observação dos valores de  $C_{\text{máx}}$ , que são superiores na raiz relativamente à parte aérea. Esta acumulação preferencial na raiz também tem sido verificada por outros autores (Iori et al., 2013; January et al., 2008).

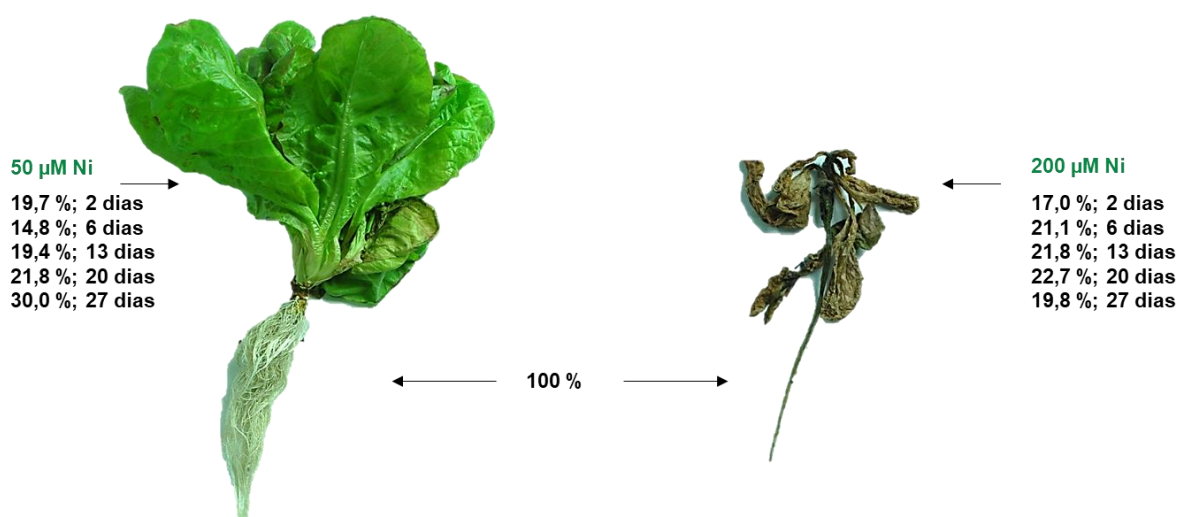
Na **Figura 4.49** encontram-se os resultados para as percentagens de Ni que são translocadas para a parte aérea das plantas contaminadas com 50 e 200  $\mu\text{M}$  de Ni, considerando como 100 % a quantidade presente na raiz.

Na alface DP, para todos os tempos de exposição são translocados entre 10,7-14,1 % (50  $\mu\text{M}$ ) e 15,3-20,5 % (200  $\mu\text{M}$ ) para a parte aérea. Na alface M4E são translocados entre 14,8-30,0 % (50  $\mu\text{M}$ ) e 17,0-22,7 % (200  $\mu\text{M}$ ). Estes valores são bastante superiores aos obtidos com Cr (**Figura 4.25**) e Pb (**Figura 4.41**), evidenciando que este elemento é bastante móvel na planta.

Nas duas cultivares, as percentagens de Ni refletem que não existem grandes variações nas percentagens de Ni translocado para a parte aérea, entre plantas contaminadas com 50 e 200  $\mu\text{M}$ . A translocação deste elemento mantém-se semelhante num meio pouco ou muito contaminado.



(a)



(b)

**Figura 4.49** – Percentagens de Ni na parte aérea de plantas de alface DP (a) e M4E (b) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 50 e 200  $\mu\text{M}$  de Ni ao longo de do tempo de exposição ao contaminante (n=3). Na figura está representado o registro fotográfico obtido ao fim de 27 dias de exposição ao contaminante.



O Ni apresenta elevada mobilidade na planta provavelmente devido ao carácter essencial deste elemento. Em elevadas concentrações consegue rapidamente mover-se das raízes até à parte superior das plantas, conseguindo passar eficazmente através da barreira da endoderme. Isto evidencia que há um equilíbrio bem definido entre o interior da planta e o Ni presente no meio.

#### *Conclusões intercalares*

É evidente uma diminuição da massa fresca da parte aérea e raiz com o aumento da concentração de Ni em solução nutritiva, para ambas as cultivares. Na alface DP esta diminuição ocorre para concentrações mais elevadas de Ni (100, 125, 150 e 200  $\mu\text{M}$ ) e tempos mais longos de exposição. Na raiz observa-se um estímulo do crescimento (50  $\mu\text{M}$ , 27 dias). Na alface M4E, este efeito de diminuição da biomassa é substancialmente mais evidente comparando com a cultivar DP, a partir da contaminação com 50  $\mu\text{M}$ , para as diferentes partes da planta. A cultivar M4E é mais afetada em termos de massa fresca, sendo isso comprovado através dos valores relativos à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz que são superiores para esta cultivar.

Em ambas as cultivares é evidente que a parte aérea é muito mais afetada em termos de diminuição do teor de água que a raiz, apresentando a cultivar M4E uma redução mais evidente. Esta diminuição do tamanho da planta pode estar relacionada com a alteração do balanço hídrico devido à presença de níquel, originando uma deficiente absorção de água que resulta no aparecimento de folhas murchas nas plantas.

Visualmente é evidente a toxicidade do níquel, observando-se uma diminuição do tamanho das folhas, aparecimento de folhas cloróticas e necroses, e raízes mais escuras e com ramificações laterais de menor dimensão.

Em relação às diferenças entre cultivares, os parâmetros obtidos ( $K_{\text{Ni}}$  e  $C_{\text{máx}}$ ) indicam que em ambas se verifica um comportamento hiperbólico para a acumulação do Ni nas diferentes partes da planta. À medida que a concentração de Ni em solução nutritiva aumenta existe uma tendência para a estabilização dos valores acumulados na planta. No entanto, a alface M4E parece conseguir acumular uma maior quantidade de níquel e o efeito na biomassa é mais notório nesta cultivar.

Através do comportamento obtido nas curvas de acumulação de Ni, pode-se referir que as duas cultivares de alface evidenciam um comportamento de plantas acumuladoras, pelo que



terão necessariamente que possuir mecanismos de destoxificação que lhes permita acumular altas quantidades de Ni nos seus tecidos.

As plantas de alface acumulam uma maior concentração de níquel nas raízes relativamente à parte aérea. Neste caso, por se tratar de um elemento essencial, não existem tantas barreiras à sua entrada na planta e, para além disso, é o primeiro órgão em contacto com o meio contaminado. No entanto, este elemento é bastante móvel na planta, uma vez que as percentagens de translocação de Ni para a parte aérea são relativamente elevadas. A translocação deste elemento mantém-se semelhante num meio pouco ou muito contaminado.

#### 4.4.6. Zinco

##### 4.4.6.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Zn

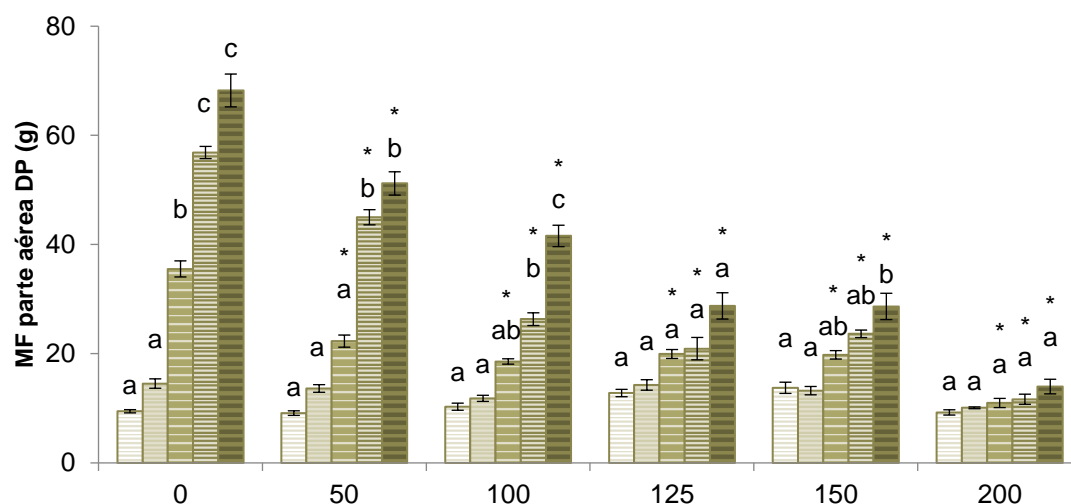
Apesar de o Zn ser considerado um elemento essencial é possível verificar, através da observação das **Figuras 4.50 e 4.51** que este elemento, em quantidades elevadas, afeta o normal desenvolvimento das plantas de alface. Na **Figura 4.52** encontram-se o registo fotográfico que reflete os sintomas visíveis de toxicidade observados nas duas cultivares de alface ao fim de 27 dias de exposição.

Um aumento na concentração de Zn na solução nutritiva leva a uma diminuição da massa fresca da parte aérea e da raiz, para ambas as cultivares.

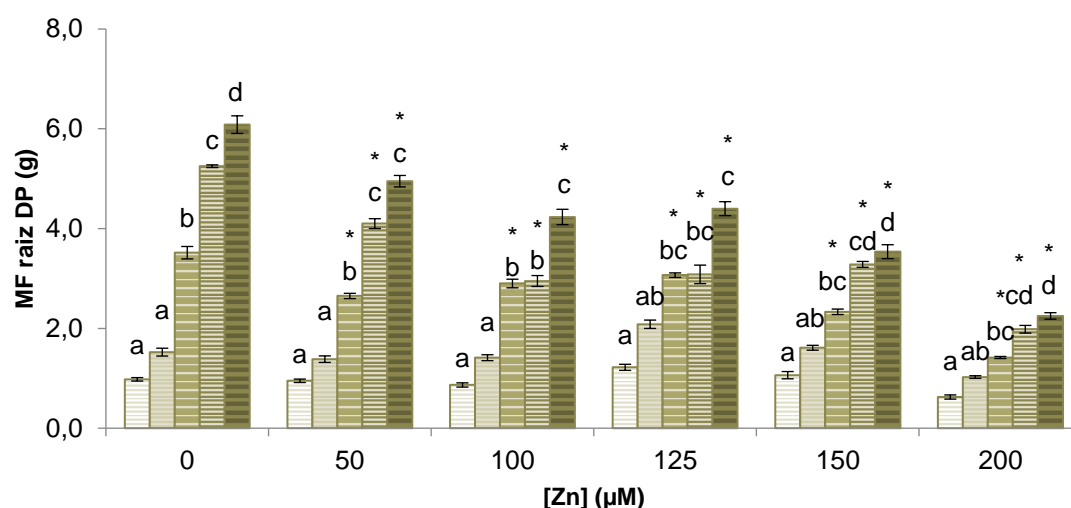
Na alface DP, existe uma diminuição significativa da massa fresca da parte aérea (**Figura 4.50-a**) e da raiz (**Figura 4.50-b**), relativamente ao controlo, em plantas contaminadas com 50-200  $\mu\text{M}$  de Zn, ao fim de 13, 20 e 27 dias de exposição.

Na alface M4E, existe uma diminuição muito acentuada nas massas frescas da parte aérea (**Figura 4.51-a**) e da raiz (**Figura 4.51-b**), que é significativa em plantas contaminadas após 27 dias de exposição com 50  $\mu\text{M}$  de Zn, e ao fim de 13, 20 e 27 dias de exposição a 100-200  $\mu\text{M}$  de Zn. Nesta cultivar, ao fim de 6 dias de exposição a 100  $\mu\text{M}$  de Zn há um estímulo do crescimento da raiz (**Figura 4.52-b**).





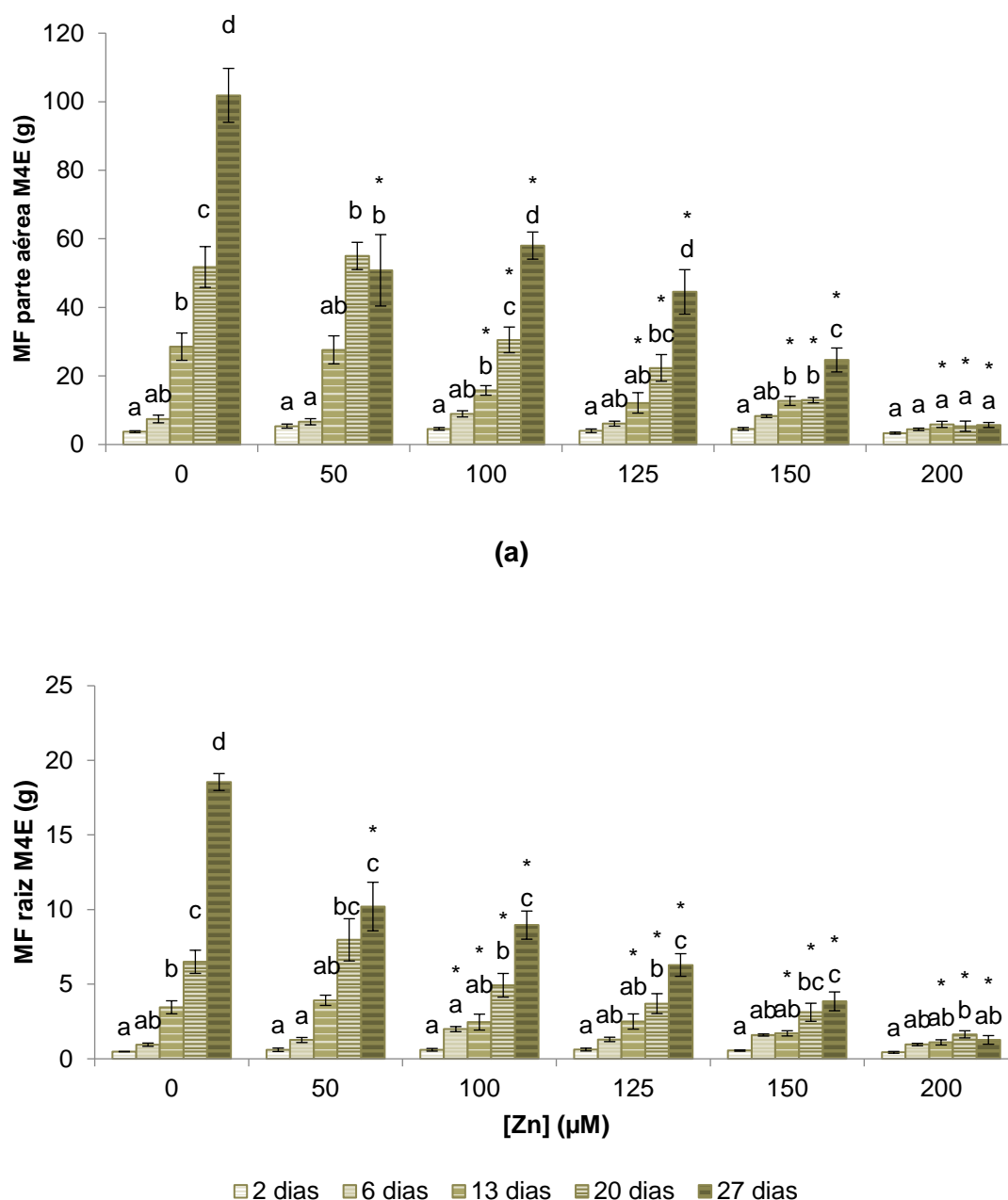
(a)



(b)

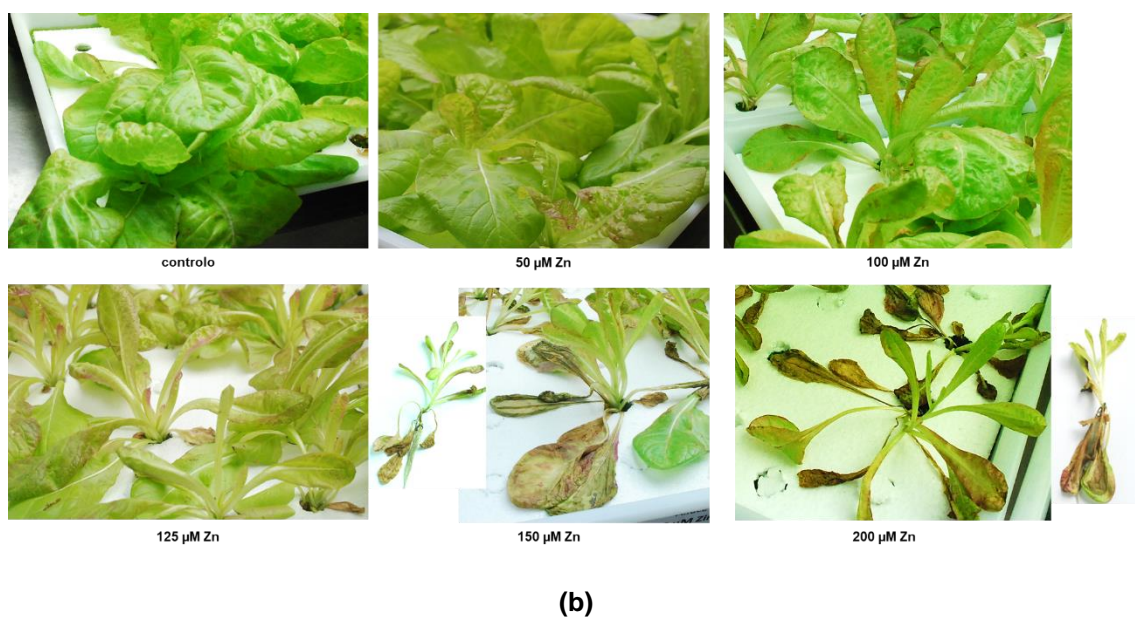
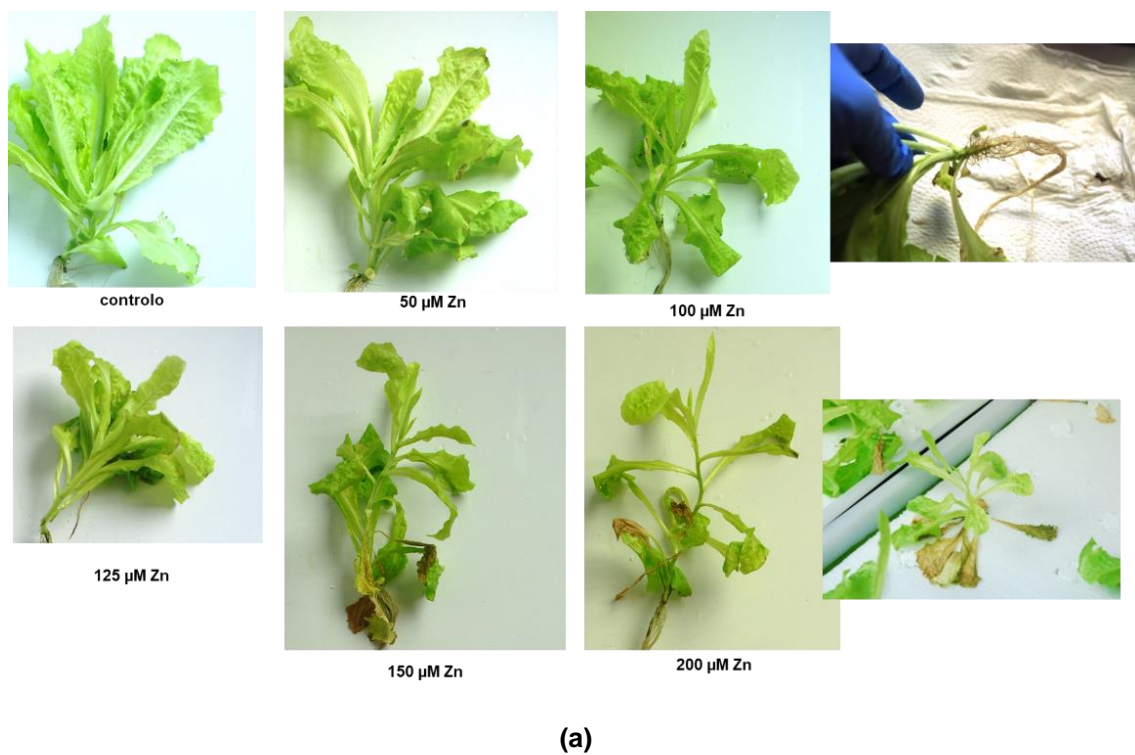
**Figura 4.50** – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 100, 125, 150 e 200 µM de Zn.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada modalidade. O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 4.51** – Massa fresca da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas de alfafa M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 100, 125, 150 e 200 µM de Zn.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada modalidade. O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 4.52** – Sintomas visíveis de toxicidade de plantas de alface DP (a) e M4E (b) expostas a Zn durante 27 dias.



Este efeito de estímulo do crescimento também foi observado por Coolong e Randle (2003). Os autores concluíram que em hidroponia, onde o Zn está praticamente todo disponível para a absorção, e existiu uma gama de concentrações (7-153  $\mu\text{M}$ ) em que ocorreu a estimulação do crescimento das plantas de *Brassica rapa*, ao fim de 6 dias de exposição. Por outro lado, uma exposição a concentrações bastante mais elevadas afetou a biomassa das plantas com o aumento da concentração de Zn (765-30590  $\mu\text{M}$ ), levando ao aparecimento de sintomas visíveis de toxicidade.

Através da observação dos gráficos é possível verificar que a alface M4E é mais afetada pela presença de Zn em solução nutritiva. Se se calcular os valores relativos à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz (200  $\mu\text{M}$ , 27 dias), comparativamente ao controlo, é possível confirmar este efeito. No caso da alface DP existe uma diminuição de 79,5 % na parte aérea, e de 63,0 % na raiz. Na alface M4E, verifica-se um maior efeito na diminuição da biomassa, com uma diminuição de 94,4 % e de 93,2 %, para a parte aérea e raiz, respetivamente.

A diminuição da biomassa em função do aumento da concentração de Zn presente em solução também tem sido verificado por outros autores. (Barrameda-Medina et al., 2014), em plantas de *Lactuca sativa* expostas a 500  $\mu\text{M}$  de Zn, durante 21 dias, observaram uma redução significativa da biomassa da parte aérea e raiz. Blasco et al. (2015) obtiveram um efeito semelhante em plantas de *Brassica rapa* contaminadas com 500  $\mu\text{M}$  de Zn (21 dias). Ivanova et al. (2010) verificaram que a exposição de plantas de colza a 1000 e 2500  $\mu\text{M}$  de Zn diminuiu a biomassa da parte aérea e da raiz, sendo esse decréscimo maior em função de um maior tempo de exposição (1-10 dias). Em 3 cultivares de brássicas também foi verificado uma diminuição da biomassa de plantas expostas a concentrações elevadas de Zn (2000  $\mu\text{M}$ , 3 dias) (Ben Ghnaya et al., 2009).

A diminuição da biomassa verificada pode estar relacionada com a alteração do balanço hídrico, pois o Zn pode interferir com a absorção de água (Gitto e Fricke, 2018) sendo isso também verificado pelo aparecimento de folhas murchas. Por este motivo, no presente trabalho calculou-se os valores médios das percentagens de teor de água presentes na parte aérea e raiz, em comparação com as plantas controlo, considerando-se uma exposição a 200  $\mu\text{M}$  de Zn, durante 27 dias.

Na alface DP verifica-se que existe uma ligeira diminuição no teor de água das plantas controlo (parte aérea: 86,5 %; raiz: 88,5 %) em relação às plantas contaminadas (parte aérea: 75,2 % e raiz: 86,2 %), sendo muito pouco significativa na raiz. Na alface M4E há uma



tendência para a redução no teor de água das plantas controlo (parte aérea: 84,4 %; raiz: 88,3 %) em relação às plantas contaminadas (parte aérea: 58,2 % e raiz: 79,2 %), sendo essa diminuição bastante evidente para a parte aérea.

Outros sintomas visíveis do efeito tóxico do Zn nas plantas são a diminuição do tamanho das folhas e raízes, o aparecimento de folhas murchas e de cloroses e necroses em folhas de plantas contaminadas com uma concentração mais elevada de Zn (150-200  $\mu\text{M}$ , 27 dias) (**Figuras 4.52**). Na alface M4E, para além desses efeitos também se observa o aparecimento de uma coloração vermelha nas folhas adultas. Nas raízes das plantas contaminadas, com o aumento da concentração de Zn, ocorre o aparecimento de escurecimento da raiz e de ramificações laterais de menores dimensões e pontas negras. Esta alteração na morfologia da raiz pode ser justificada como referido para as plantas contaminadas com Cd em **4.4.1.1**.

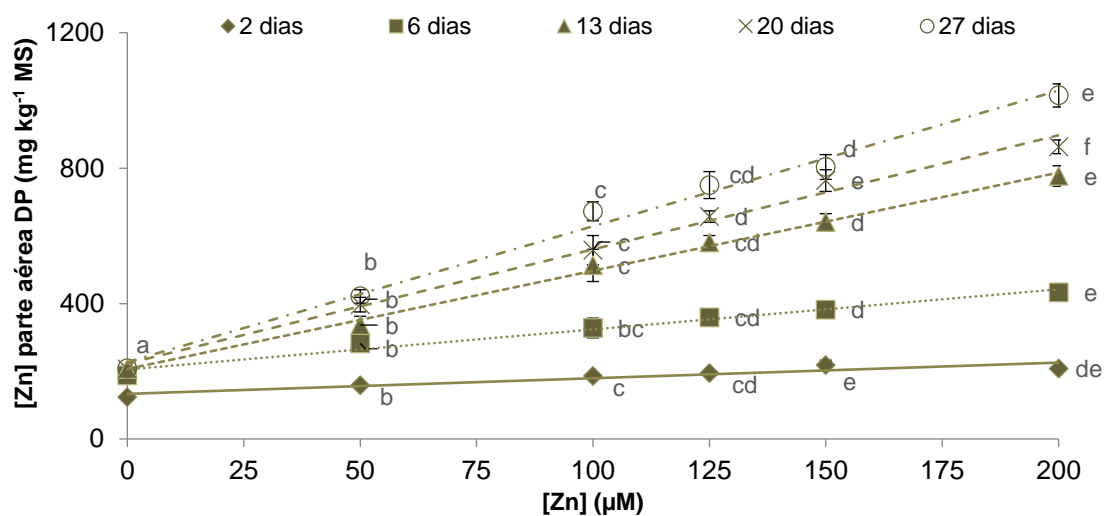
Diversos autores têm descrito o efeito do Zn no crescimento e aspeto exterior das plantas, como o aparecimento de cloroses visíveis em folhas de beterraba (Sagardoy et al., 2009), síntese de antocianinas e vermelhidão nas folhas quando expostas a elevadas concentrações de Zn (0,8-80  $\mu\text{M}$ , 14 dias) em plantas de soja (Fontes e Cox, 1995) e observação de pontos necróticos acastanhados e inibição do crescimento (Broadley et al., 2007).

Coolong e Randle (2003) verificaram que as plantas de *Brassica rapa* expostas a concentrações inferiores a 765  $\mu\text{M}$  apresentaram sintomas de toxicidade leves bem como um crescimento atrofiado e lento da raiz e parte aérea. Por outro lado, plantas expostas a concentrações  $\geq 7648 \mu\text{M}$  de Zn apresentaram sintomas visíveis de toxicidade, tais como cloroses nas folhas, uma tonalidade púrpura devido à deficiência em P provocada pelo excesso de Zn, morte da raiz e o crescimento da planta muito afetado.

#### 4.4.6.2. Caracterização da acumulação de Zn

Nas **Figuras 4.53-4.56** apresentam-se os resultados obtidos para as concentrações de Zn acumuladas na parte aérea e raiz, para as duas cultivares de alface.

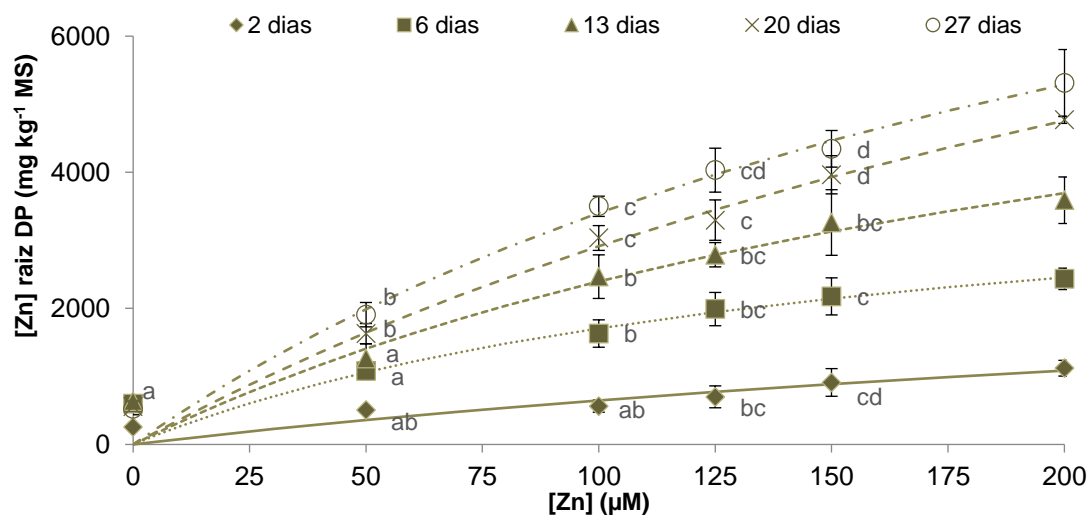
A acumulação de Zn na parte aérea apresenta um comportamento linear, ou seja, há uma acumulação crescente e proporcional em função da concentração de Zn em solução nutritiva. Nestas condições de ensaio, verifica-se que existe um ajuste razoável ao modelo linear, tal como indicam os valores de  $R^2 > 0,88$ .



dias	<i>m</i>	<i>b</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	Linha
2	0,46	133,20	0,8816	—
6	1,18	205,25	0,9794	.....
13	2,90	206,69	0,9967	-----
20	3,37	223,05	0,9904	----
27	4,01	227,27	0,9912	-.-.-.

**Figura 4.53** – Concentração de Zn na parte aérea de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 100, 125, 150 e 200  $\mu\text{M}$  de Zn.

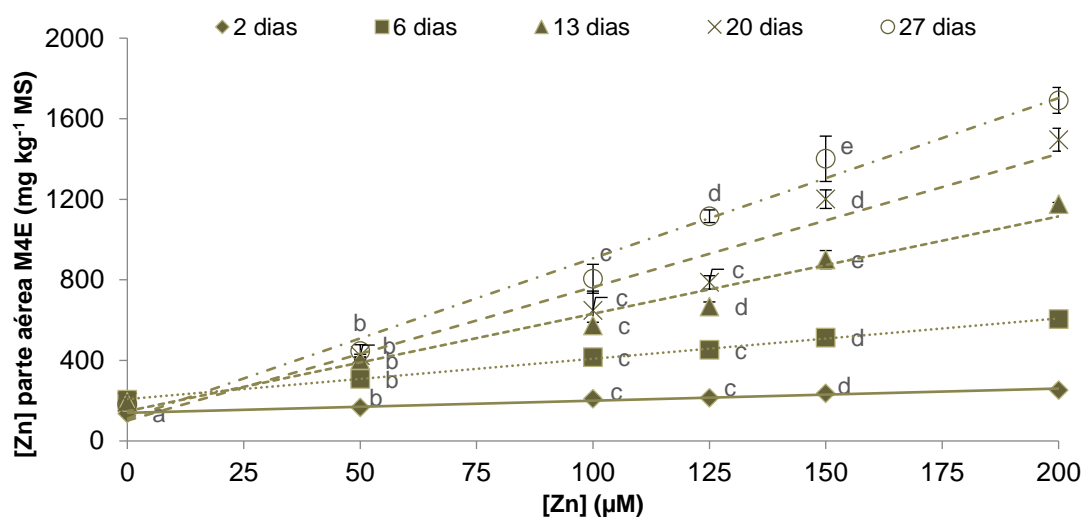
As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



dias	<i>C</i> <sub>máx</sub>	<i>K</i> <sub>Zn</sub>	<i>R</i> <sup>2</sup>	Linha
2	3333,2	414,2	0,7895	—
6	4369,5	156,0	0,8478	.....
13	8071,9	237,0	0,9314	-----
20	12967,7	345,1	0,9717	----
27	11884,4	249,3	0,9798	-.-.-.

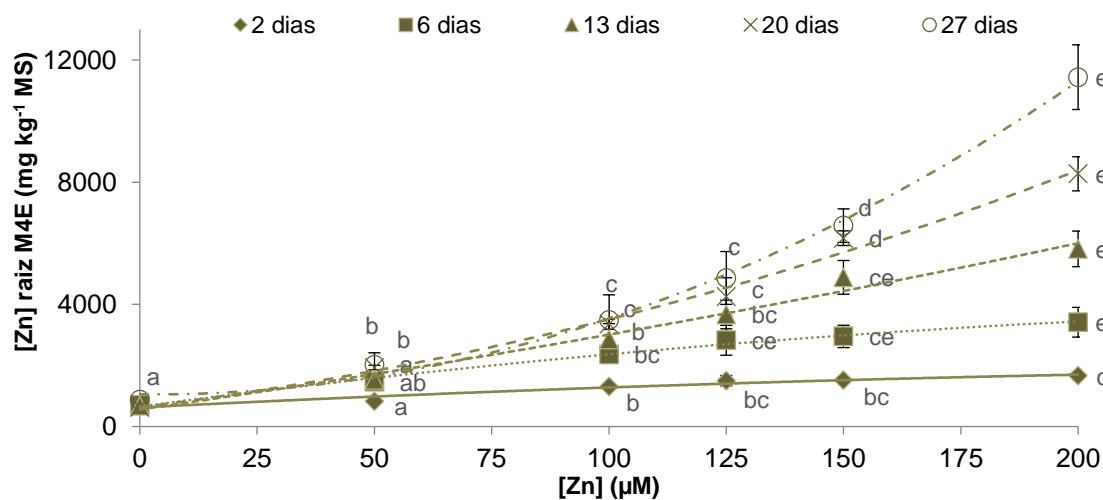
**Figura 4.54** – Concentração de Zn na raiz de plantas de alface DP ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 100, 125, 150 e 200  $\mu\text{M}$  de Zn.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 4.55** – Concentração de Zn na parte aérea de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 100, 125, 150 e 200 µM de Zn.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).



**Figura 4.56** – Concentração de Zn na raiz de plantas de alface M4E ao longo do tempo de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50, 100, 125, 150 e 200 µM de Zn.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).





Relativamente às diferenças entre cultivares, os parâmetros obtidos indicam que as duas cultivares de alface demonstram ter o mesmo comportamento linear na acumulação de Zn na parte aérea. No estudo, já referido anteriormente, de Coolong e Randle (2003), os autores verificaram que a acumulação de Zn pela parte aérea de *Brassica rapa* teve um comportamento linear, tal como se verifica para as duas cultivares de alface neste trabalho.

No entanto, as raízes das duas cultivares de alface apresentam um comportamento diferente. No caso da alface DP, o modelo hiperbólico é o que melhor se ajusta aos resultados obtidos (4.3.5.2.), tal como indicam os valores de  $R^2 > 0,78$ . Estes ajustes estão representados pelas linhas das **Figuras 4.54**, assim como os parâmetros desse ajuste. Em solução nutritiva a disponibilidade de Zn é praticamente completa, pelo que apesar de não se terem atingindo valores de saturação nas condições do ensaio, pode-se considerar adequada a utilização deste modelo hiperbólico na caracterização da acumulação do Zn.

Os parâmetros  $C_{\text{máx}}$  e  $K_{\text{Zn}}$  caracterizam o processo de acumulação de Zn. O  $C_{\text{máx}}$  aumenta com o tempo de exposição ao Zn, isto é, existe uma maior acumulação quando o Zn presente em solução nutritiva está disponível durante um maior período de tempo. Para todos os tempos de exposição verifica-se que o mecanismo de acumulação é semelhante e por isso é descrito pelo mesmo tipo de curva ajustada.

À medida que a concentração de Zn em solução nutritiva aumenta, há uma tendência para acumular uma maior quantidade de Zn na raiz da alface DP, existindo uma tendência para a estabilização de Zn na planta. Estas plantas deverão possuir mecanismos de destoxificação que lhes permitem acumular quantidades elevadas destes elementos e controlar o desenvolvimento de toxicidade.

A alface M4E apresenta um comportamento polinomial (4.3.5.2.), tal como indicam os valores de  $R^2 > 0,98$ . Este comportamento indica que à medida que se aumenta a concentração de Zn disponível em solução nutritiva, existe uma acumulação crescente de Zn na raiz (**Figura 4.56**), o que indica que não há regulação dos mecanismos de entrada de Zn na planta para elevadas concentrações de Zn disponíveis em solução. Este comportamento parece evidenciar que a alface M4E tem um comportamento de planta exclusora de Zn de acordo com as curvas descritas em **Figura 4.6**. De acordo com Prasad (2004), quando as concentrações do EPT são demasiado altas as plantas exclusoras perdem o efeito barreira à sua entrada pelo que a acumulação aumenta de forma muito considerável.

Em diversas plantas, alguns autores também verificaram que à medida que se aumenta a concentração de Zn em solução nutritiva a planta tem tendência a acumular uma maior



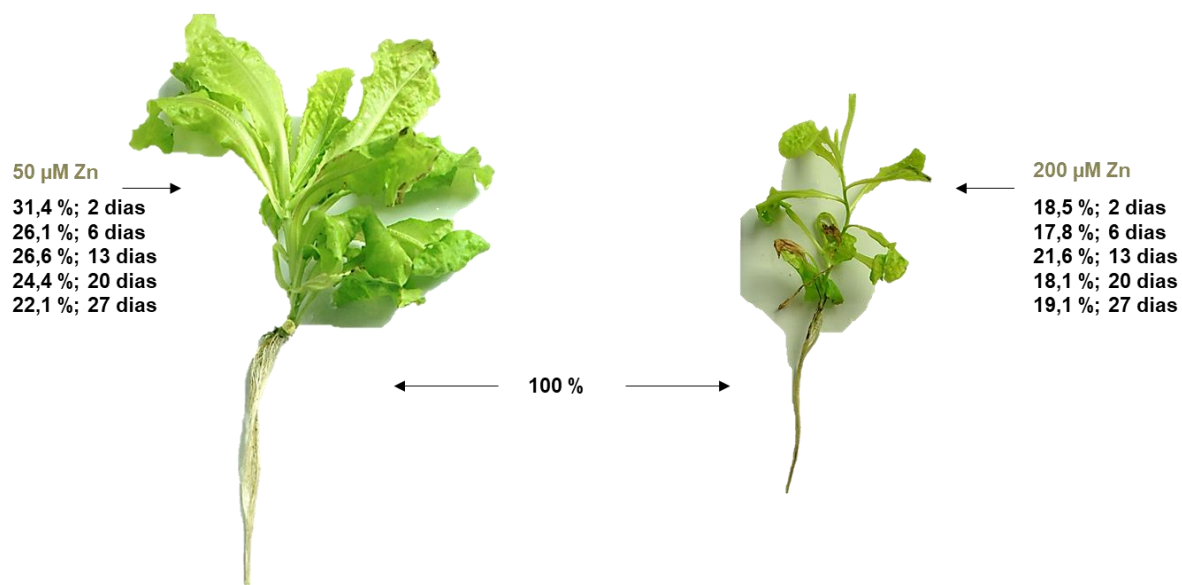
quantidade deste elemento (Ben Ghnaya et al., 2009; Bernardini et al., 2016; Ivanova et al., 2010; Sbartai et al., 2012), designadamente em alface (Meagy et al., 2016)

As plantas de alface acumulam uma maior concentração de Zn nas raízes relativamente à parte aérea. Ao fim de 2 dias de exposição a 50  $\mu\text{M}$  de Zn, as raízes acumulam  $502,71 \pm 35,99$  mg de Zn  $\text{kg}^{-1}$  MS (DP) e  $829,56 \pm 101,67$  mg de Zn  $\text{kg}^{-1}$  MS (M4E), enquanto nas folhas essa quantidade é menor, há uma acumulação de  $158,03 \pm 6,68$  mg de Zn  $\text{kg}^{-1}$  MS (DP) e  $166,57 \pm 2,42$  mg de Zn  $\text{kg}^{-1}$  MS (M4E). Na planta adulta, as raízes acumulam  $5310,94 \pm 492,96$  mg de Zn  $\text{kg}^{-1}$  MF (DP) e  $11438,27 \pm 1058,42$  mg de Zn  $\text{kg}^{-1}$  MF (M4E) e nas folhas existe uma acumulação inferior de  $1014,70 \pm 34,10$  mg de Zn  $\text{kg}^{-1}$  MF (DP) e  $1691,11 \pm 64,22$  mg de Zn  $\text{kg}^{-1}$  MF (M4E), quando as plantas são expostas durante 27 dias, a 200  $\mu\text{M}$  de Zn.

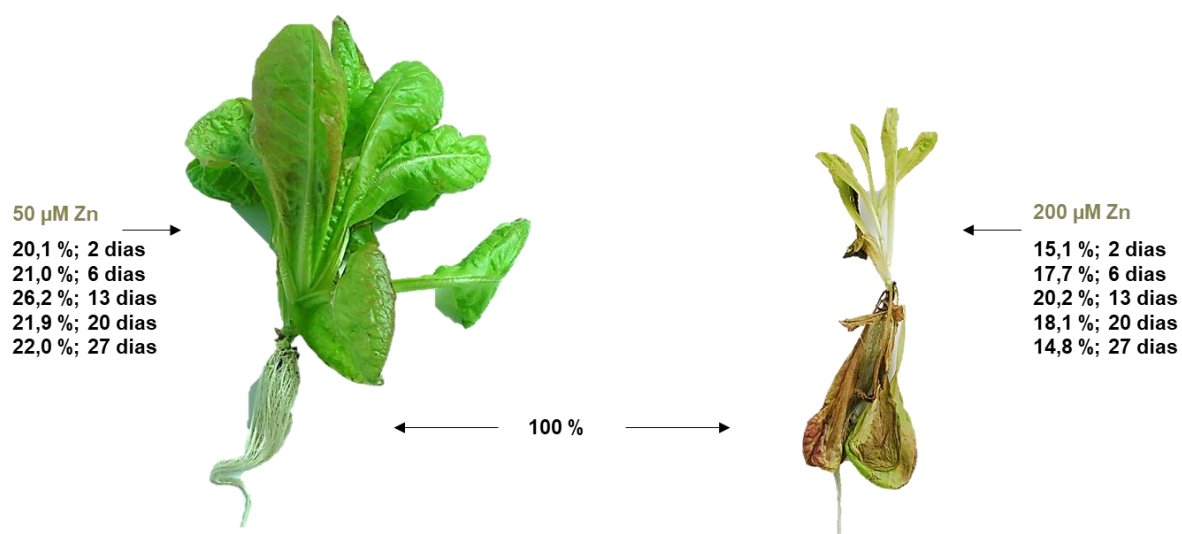
Através da observação dos resultados observa-se que as folhas acumulam também grandes quantidades de Zn nos seus tecidos, comparativamente a todos os outros EPTs estudados no presente trabalho. Isto evidencia que este elemento por ser essencial é bastante móvel na planta. As raízes absorvem o Zn, sendo posteriormente transportado no xilema, onde é quelatado com diferentes moléculas e distribuído por toda a planta podendo a maior parte ficar armazenada nos vacúolos.

É possível também verificar que existem diferenças na quantidade acumulada de Zn pela raiz das duas cultivares, o que está de acordo com o comportamento de acumulação observado anteriormente. A alface M4E acumula substancialmente uma maior quantidade de Zn na raiz, cerca do dobro comparativamente com a outra cultivar (200  $\mu\text{M}$ , 27 dias). Na parte aérea não se verificam grandes variações nos teores de Zn acumulados para ambas as cultivares. Barrameda-Medina et al. (2014) também observaram que as plantas de alface expostas a 500  $\mu\text{M}$  acumularam principalmente Zn nas raízes. Em plantas de colza expostas a 1000 e 2500  $\mu\text{M}$ , o Zn acumulou-se preferencialmente nas raízes ao longo do tempo (1, 5 e 10 dias) (Ivanova et al., 2010).

Na **Figura 4.57** estão representadas as percentagens de Zn acumulado na parte aérea de plantas de alface DP (**Figura 4.57-a**) e M4E (**Figura 4.57-b**) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 50 e 200  $\mu\text{M}$  de Zn ao longo do tempo de exposição ao contaminante.



(a)



(b)

**Figura 4.57** – Percentagens de Zn na parte aérea de plantas de alface DP (a) e M4E (b) em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 50 e 200  $\mu\text{M}$  de Zn ao longo do tempo de exposição ao contaminante ( $n=3$ ). Na figura está representado o registro fotográfico obtido ao fim de 27 dias de exposição ao contaminante.



Na alface DP, para todos os tempos de exposição são translocados entre 22,1-31,4 % (50  $\mu$ M) e 17,8-21,6 % (200  $\mu$ M) para a parte aérea. Na alface M4E são translocados entre 20,1-26,2 % (50  $\mu$ M) e 14,8-20,2 % (200  $\mu$ M).

As percentagens de Zn na parte aérea refletem que, por se tratar de um elemento essencial, o Zn apresenta elevada mobilidade na planta, conseguindo passar eficazmente através da barreira da endoderme. Não existe grande variação das percentagens nem ao longo do tempo nem em função da concentração de Zn presente na solução nutritiva, o que evidencia que há um equilíbrio bem definido entre o interior da planta e o Zn presente em solução.

#### *Conclusões intercalares*

Um aumento na concentração de Zn na solução nutritiva leva a uma diminuição da massa fresca da parte aérea e da raiz, na alface DP (50-200  $\mu$ M Zn, 13, 20 e 27 dias) e na alface M4E (50  $\mu$ M, 27 dias; 100-200  $\mu$ M, 13, 20 e 27 dias). Nesta cultivar, verifica-se um estímulo do crescimento da raiz (100  $\mu$ M Zn, 6 dias). A alface M4E é mais afetada pela presença de Zn em solução nutritiva, sendo isso comprovado por uma diminuição percentual da biomassa mais acentuada nesta cultivar.

O zinco interfere com a absorção de água, sendo isso verificado através dos valores médios das percentagens de teor de humidade, presentes na parte aérea e raiz, e pelo aparecimento de folhas murchas. Outros sintomas visíveis de toxicidade são cloroses e necroses em folhas, escurecimento da raiz, ramificações laterais de menores dimensões e extremidades negras. Na alface M4E também se observa uma coloração vermelha nas folhas adultas.

A acumulação de Zn na parte aérea das duas cultivares apresenta um comportamento linear, ou seja, há uma acumulação crescente e proporcional em função da concentração de zinco em solução nutritiva.

Contudo, as raízes das duas cultivares de alface apresentam um comportamento diferente em relação à acumulação de Zn que é explicada por um modelo hiperbólico e polinomial nas cultivares DP e M4E, respetivamente, indicando que há mecanismos diferentes envolvidos neste processo nos diferentes órgãos. Neste caso, à medida que a concentração de Zn em solução nutritiva aumenta, há uma tendência para acumular uma maior quantidade de Zn na raiz da alface DP, existindo uma tendência para a estabilização de Zn na planta. Esta planta acumula quantidades elevadas de Zn até na presença de baixas concentrações em solução nutritiva, pelo que deverá possuir mecanismos de destoxificação que lhe permite acumular



estas elevadas quantidades de Zn neste órgão. No caso da acumulação de Zn na raiz da alface M4E, o ajuste ao modelo polinomial sugere que esta cultivar tem um comportamento de planta exclusora pelo que, em concentrações elevadas de Zn, perde-se o efeito barreira permitindo dessa forma a ocorrência de uma acumulação deste elemento.

É possível verificar que existem diferenças na quantidade de Zn acumulada pela raiz das duas cultivares, o que está de acordo com o comportamento de acumulação observado. A alface M4E acumula substancialmente uma maior quantidade de zinco na raiz.

As folhas acumulam elevadas quantidades de zinco, comparativamente com todos os outros EPTs estudados, indicando que o Zn é bastante móvel na planta. Este comportamento é comprovado neste trabalho pelos valores percentuais de Zn que são translocadas para a parte aérea.

A alface M4E é, aparentemente, mais afetada pela acumulação de Zn do que a DP, pois os valores acumulados são superiores e os efeitos tóxicos verificados mais intensos, como sejam a diminuição da biomassa e os sintomas visíveis.

#### 4.5. Avaliação da toxicidade dos EPTs estudados

Nas **Tabela 4.3** e **4.4** encontram-se os resultados obtidos para o Índice de Tolerância (IT), das plantas de alface contaminadas, ao fim de 2 e 27 dias de exposição, respetivamente. Estes resultados permitem caracterizar a tolerância das duas cultivares face à presença destes elementos em solução nutritiva.

Na exposição a 2 dias, a maior parte dos valores obtidos está próxima de 100 % (que é o valor obtido para as plantas controlo), o que evidencia uma certa tolerância das plantas jovens de alface DP à exposição aos diferentes EPTs. Na alface M4E jovem já se observam alguns valores de concentrações de EPTs a partir dos quais o IT é inferior a 50 % (**Tabela 4.3**). Isto evidencia que a planta jovem apresenta uma elevada tolerância inicial à presença destes EPTs, nestas condições de ensaio.

Com a exposição a 27 dias (**Tabela 4.4**), é possível verificar que o Cd teve um efeito mais intenso na cultivar M4E, tanto na raiz (23,7 %) como na parte aérea (12,9 %), uma vez que apresenta valores ligeiramente mais baixos de IT, relativamente à cultivar DP (parte aérea: 18,4 %, raiz: 30,4 %).



**Tabela 4.3** – Índice de tolerância de plantas de alface, DP e M4E, contaminadas com as diferentes concentrações de Cd, Cu, Cr, Pb, Ni ou Zn, ao fim de 2 dias de exposição a cada contaminante.

Índice de tolerância (IT) (%) 2 dias													
DP							M4E						
Cd (µM)	0	5	10	15	25	50	Cd (µM)	0	5	10	15	25	50
parte aérea	100,0	145,76	114,99	102,96	105,92	124,85	parte aérea	100,0	86,1	72,8	75,4	63,7	56,9
raiz	100,0	146,3	125,4	120,9	127,6	123,9	raiz	100,0	103,4	120,3	88,1	48,3	33,1
Cr (µM)	0	50	75	100	125	150	Cr (µM)	0	50	75	100	125	150
parte aérea	100,0	113,5	78,9	111,2	114,6	107,1	parte aérea	100,0	58,4	70,4	54,8	54,3	60,7
raiz	100,0	71,4	82,9	85,7	82,9	60,0	raiz	100,0	46,3	52,0	54,9	46,3	48,8
Pb (µM)	0	50	75	100	125	150	Pb (µM)	0	50	75	100	125	150
parte aérea	100,0	98,2	101,3	64,1	76,0	53,8	parte aérea	100,0	71,0	47,9	65,6	74,4	58,8
raiz	100,0	118,4	139,5	126,3	118,4	126,3	raiz	100,0	78,7	63,9	83,6	102,0	63,9
Cu (µM)	0	10	15	25	35	50	Cu (µM)	0	10	15	25	35	50
parte aérea	100,0	108,9	104,3	103,5	111,7	91,8	parte aérea	100,0	79,6	91,3	78,6	79,8	68,6
raiz	100,0	112,2	92,7	104,9	114,6	92,7	raiz	100,0	88,8	88,2	75,6	72,8	60,9
Ni (µM)	0	50	100	125	150	200	Ni (µM)	0	50	100	125	150	200
parte aérea	100,0	88,2	93,2	83,4	96,4	68,6	parte aérea	100,0	97,2	95,4	103,3	79,6	87,9
raiz	100,0	110,1	113,2	96,6	117,4	74,8	raiz	100,0	102,9	102,3	78,9	85,4	82,0
Zn (µM)	0	50	100	125	150	200	Zn (µM)	0	50	100	125	150	200
parte aérea	100,0	96,4	108,9	135,3	145,5	97,8	parte aérea	100,0	143,3	121,7	106,8	121,2	88,9
raiz	100,0	96,9	88,4	124,5	108,4	63,8	raiz	100,0	125,0	125,0	128,1	114,9	89,9

O sombreado cinza indica os valores de concentração de metal a partir dos quais o IT é inferior a 50 %, comparativamente ao controle.

**Tabela 4.4** - Índice de tolerância de plantas de alface, DP e M4E, contaminadas com as diferentes concentrações de Cd, Cu, Cr, Pb, Ni ou Zn, ao fim de 27 dias de exposição a cada contaminante.

Índice de tolerância (IT) (%) 27 dias													
DP							M4E						
Cd (µM)	0	5	10	15	25	50	Cd (µM)	0	5	10	15	25	50
parte aérea	100,0	60,9	46,5	23,9	23,3	18,4	parte aérea	100,0	84,0	36,0	7,8	10,2	12,9
raiz	100,0	93,5	70,2	64,4	45,4	30,4	raiz	100,0	48,6	43,0	19,3	22,7	23,7
Cr (µM)	0	50	75	100	125	150	Cr (µM)	0	50	75	100	125	150
parte aérea	100,0	5,3	5,1	2,9	2,6	2,5	parte aérea	100,0	3,1	2,0	1,8	1,6	1,4
raiz	100,0	15,3	12,6	9,0	4,8	4,3	raiz	100,0	7,3	2,8	2,9	4,2	3,6
Pb (µM)	0	50	75	100	125	150	Pb (µM)	0	50	75	100	125	150
parte aérea	100,0	146,3	168,1	131,4	100,4	32,4	parte aérea	100,0	112,3	111,1	63,4	69,1	58,1
raiz	100,0	170,6	194,3	121,5	115,4	91,9	raiz	100,0	156,1	167,8	162,2	104,5	96,1
Cu (µM)	0	10	15	25	35	50	Cu (µM)	0	10	15	25	35	50
parte aérea	100,0	100,2	81,1	43,8	18,6	11,9	parte aérea	100,0	125,4	81,9	62,2	45,4	12,3
raiz	100,0	109,9	84,3	68,4	27,6	20,6	raiz	100,0	124,4	106,1	75,7	81,9	27,1
Ni (µM)	0	50	100	125	150	200	Ni (µM)	0	50	100	125	150	200
parte aérea	100,0	101,1	32,9	29,8	15,7	5,3	parte aérea	100,0	62,6	9,5	1,6	1,5	2,6
raiz	100,0	127,8	69,0	50,5	32,0	12,4	raiz	100,0	81,9	16,5	6,5	5,7	7,0
Zn (µM)	0	50	100	125	150	200	Zn (µM)	0	50	100	125	150	200
parte aérea	100,0	75,0	60,9	42,2	42,0	20,5	parte aérea	100,0	49,9	57,0	43,7	24,2	5,6
raiz	100,0	81,4	69,6	72,3	58,2	37,0	raiz	100,0	55,0	48,3	33,9	20,8	6,8

O sombreado cinza indica os valores de concentração de metal a partir dos quais o IT é inferior a 50 %, comparativamente ao controle.





A presença de Cr tem um efeito idêntico para ambas as cultivares. É possível observar-se valores de IT inferiores a 50 % a partir da contaminação com 50  $\mu\text{M}$ . A exposição a 150  $\mu\text{M}$  origina os menores valores de IT na parte aérea (DP: 2,5 %; M4E: 1,4 %) e raiz (DP: 4,3 %; M4E: 3,6 %), comparativamente aos outros EPTs.

O Pb é o elemento que tem um menor efeito nas duas cultivares, sendo a maior parte dos valores de IT obtidos superiores a 50 %. Na alface M4E não se observam valores de IT inferiores a 50 %. Na alface DP apenas a parte aérea apresenta um IT de 32,4 % (150  $\mu\text{M}$ ), enquanto na alface M4E a exposição a essa concentração resulta num IT de 58,1 %, evidenciando que esta cultivar é mais tolerante à presença de chumbo. Na raiz, a exposição a esta concentração mais elevada, origina valores de IT bastante elevados (DP: 91,9 %; M4E: 96,1 %), o que permite verificar que, nestas condições de ensaio, a raiz é mais tolerante à presença deste elemento que a parte aérea.

A cultivar DP, aparentemente, manifesta ser menos tolerante à presença de cobre. Na parte aérea da alface DP a exposição a 25  $\mu\text{M}$  de Cu apresenta um IT de 43,8 %, enquanto na alface M4E apenas a aplicação de concentração de 35  $\mu\text{M}$  permite ter um comportamento semelhante no IT (45,4 %). Um comportamento parecido é observado na raiz, a exposição a 35  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  origina valores de IT de 27,6 % e 27,1 %, na alface DP e M4E, respetivamente.

A alface M4E é muito mais sensível à presença de Ni, sendo isto evidenciado pelos resultados obtidos de IT. A partir da exposição a 100  $\mu\text{M}$  obtém-se valores de IT inferiores a 50 %, tanto na parte aérea (9,5 %) como na raiz (16,5 %). Na alface DP, estes valores de IT inferiores a 50 % observam-se na parte aérea (32,9 %) a partir da mesma concentração de Ni, enquanto na raiz esse efeito só se observa a partir de 150  $\mu\text{M}$  (32,0 %).

A presença de Zn tem um efeito muito parecido na parte aérea de ambas as cultivares. A partir de 125  $\mu\text{M}$  verificam-se valores de IT inferiores a 50 % (DP: 42,2 %; M4E: 43,7 %). A raiz da alface M4E demonstra ser mais sensível à presença deste elemento. Na alface DP, apenas a exposição a 200  $\mu\text{M}$  origina um valor de IT inferior a 50 % (37,0 %), por outro lado na alface M4E com essa concentração obtém-se um IT muito menor (6,8 %).

Nas **Tabelas 4.5 e 4.6** encontram-se os resultados obtidos para a concentração de metal que inibe em 50 % o crescimento da raiz ( $\text{LC}_{50}$ ) das plantas de alface contaminadas, ao fim de 2 e 27 dias de exposição, respetivamente.



**Tabela 4.5** – Concentração de metal que inibe em 50 % o crescimento da raiz ( $LC_{50}$ ) de plantas de alface, DP e M4E, contaminadas com as diferentes concentrações de Cd, Cu, Cr, Pb, Ni ou Zn, ao fim de 2 dias de exposição a cada contaminante.

<b>LC<sub>50</sub> (%)</b>						
<b>2 dias</b>						
<b>DP</b>						
<b>Cd (μM)</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>25</b>	<b>50</b>
	0	-46,27	-25,37	-20,90	-27,61	-23,88
<b>Cr (μM)</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>100</b>	<b>125</b>	<b>150</b>
	0	28,57	17,14	14,29	17,14	40,00
<b>Pb (μM)</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>100</b>	<b>125</b>	<b>150</b>
	0	-18,42	-39,47	-26,32	-18,42	-26,32
<b>Cu (μM)</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>25</b>	<b>35</b>	<b>50</b>
	0	-12,20	7,32	-4,88	-14,63	7,32
<b>Ni (μM)</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>125</b>	<b>150</b>	<b>200</b>
	0	-10,13	-13,25	3,38	-17,40	25,19
<b>Zn (μM)</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>125</b>	<b>150</b>	<b>200</b>
	0	3,06	11,56	-24,49	-8,42	36,22
<b>M4E</b>						
<b>Cd (μM)</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>25</b>	<b>50</b>
	0	-3,39	-20,34	11,86	51,69	66,95
<b>Cr (μM)</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>100</b>	<b>125</b>	<b>150</b>
	0	53,66	47,97	45,12	53,66	51,22
<b>Pb (μM)</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>100</b>	<b>125</b>	<b>150</b>
	0	21,31	36,07	16,39	-2,05	36,07
<b>Cu (μM)</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>25</b>	<b>35</b>	<b>50</b>
	0	11,23	11,83	24,42	27,25	39,07
<b>Ni (μM)</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>125</b>	<b>150</b>	<b>200</b>
	0	-2,86	-2,26	21,05	14,59	18,05
<b>Zn (μM)</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>125</b>	<b>150</b>	<b>200</b>
	0	-25,00	-25,00	-28,10	-14,88	10,12

O sombreado cinza indica os valores de concentração de metal a partir existe uma inibição de 50 % ou mais, comparativamente ao controle.



**Tabela 4.6** – Concentração de metal que inibe em 50 % o crescimento da raiz ( $LC_{50}$ ) de plantas de alface, DP e M4E, contaminadas com as diferentes concentrações de Cd, Cu, Cr, Pb, Ni ou Zn, ao fim de 27 dias de exposição a cada contaminante.

							$LC_{50}$ (%) 27 dias						
DP							M4E						
Cd ( $\mu$ M)	0	5	10	15	25	50	Cd ( $\mu$ M)	0	5	10	15	25	50
	0	6,51	29,80	35,55	54,61	69,59		0	51,38	57,03	80,73	77,26	76,30
Cr ( $\mu$ M)	0	50	75	100	125	150	Cr ( $\mu$ M)	0	50	75	100	125	150
	0	84,68	87,37	91,04	95,16	95,70		0	92,73	97,16	97,10	95,82	96,42
Pb ( $\mu$ M)	0	50	75	100	125	150	Pb ( $\mu$ M)	0	50	75	100	125	150
	0	-70,58	-94,26	-21,50	-15,40	8,09		0	-56,14	-67,84	-62,18	-4,48	3,87
Cu ( $\mu$ M)	0	10	15	25	35	50	Cu ( $\mu$ M)	0	10	15	25	35	50
	0	-9,93	15,69	31,62	72,43	79,41		0	-24,45	-6,15	24,28	18,10	72,91
Ni ( $\mu$ M)	0	50	100	125	150	200	Ni ( $\mu$ M)	0	50	100	125	150	200
	0	-27,76	31,02	49,53	68,03	87,59		0	18,12	83,50	93,52	94,30	93,05
Zn ( $\mu$ M)	0	50	100	125	150	200	Zn ( $\mu$ M)	0	50	100	125	150	200
	0	18,63	30,41	27,67	41,85	63,01		0	44,97	51,69	66,10	79,22	93,17

O sombreado cinza indica os valores de concentração de metal a partir existe uma inibição de 50 % ou mais, comparativamente ao controle.



Ao fim de 2 dias de exposição, na alface DP a maior parte dos valores obtidos de  $LC_{50}$  está acima do valor de 50 %, evidenciando que não existem concentrações de EPT que inibem em 50 % o crescimento da raiz, ou seja, não existe uma elevada inibição deste órgão nesta cultivar. Na planta M4E jovem já se observam alguns valores de concentrações de EPTs a partir dos quais existe uma inibição em 50 % do crescimento da raiz, nomeadamente com Cd e Cr.

Com a exposição a 27 dias, na alface DP apenas a partir da presença de 25  $\mu\text{M}$  de Cd, é que se obtém uma inibição em 54,61 % do crescimento da raiz. Na alface M4E, a aplicação de 5  $\mu\text{M}$  de Cd, já provoca uma inibição de 51,38 %, o que evidencia um maior efeito deste elemento. A exposição a 50  $\mu\text{M}$  origina um valor de  $LC_{50}$  superior na alface M4E (76,30 %) em relação à alface DP (69,59 %).

Com a presença de Cr, ambas as cultivares são afetadas de igual modo, o efeito verifica-se a partir de 50  $\mu\text{M}$ . Na presença deste elemento observa-se percentagens de inibição bastante elevadas e comparando as duas cultivares é possível verificar que a exposição a 150  $\mu\text{M}$  tem efetivamente valores de  $LC_{50}$  muito semelhantes na alface DP (95,70 %) e M4E (96,42 %).

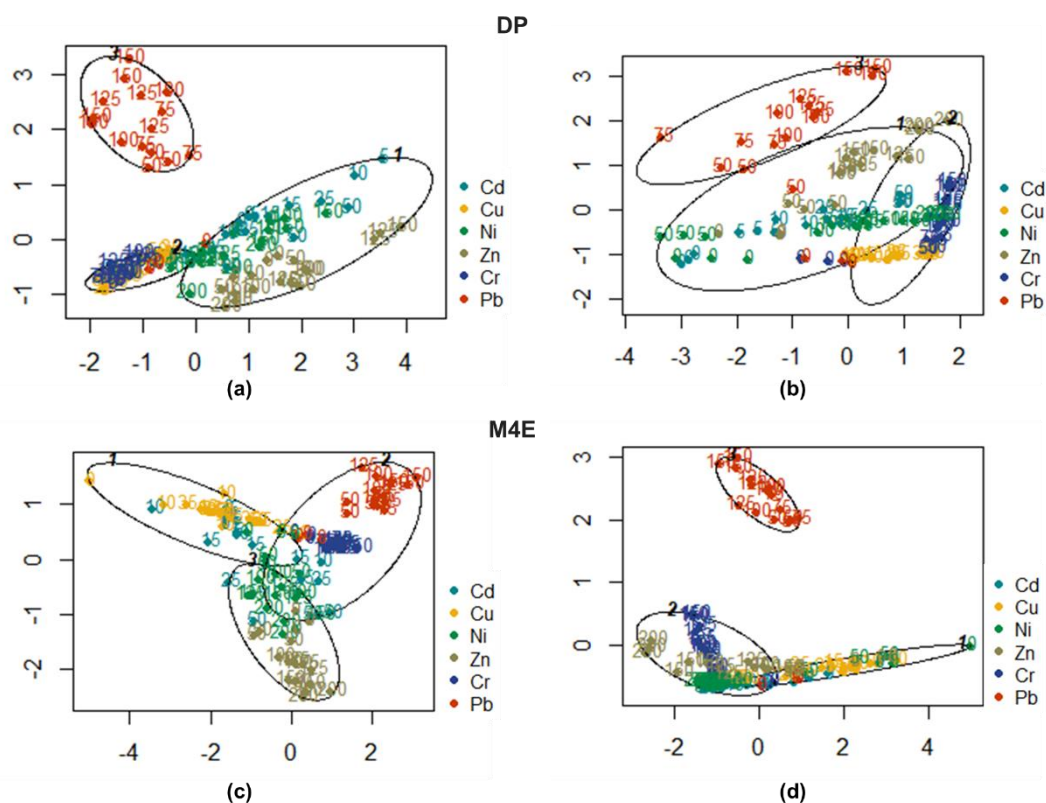
O Pb não apresenta nenhum efeito relevante na inibição do crescimento da raiz, daí se ter obtidos valores muito baixos de  $LC_{50}$  na alface DP (8,09 %) e M4E (3,87 %).

Com a exposição ao Cu, a situação já é diferente. A raiz da alface DP é ligeiramente mais inibida na presença deste elemento, verificando-se que a presença de 35  $\mu\text{M}$  de Cu inibe em 72,43 % o crescimento da raiz, enquanto apenas uma concentração maior de 50  $\mu\text{M}$  de Cu tem praticamente o mesmo efeito na alface M4E (72,91 %).

O Ni afeta muito mais o desenvolvimento da raiz da alface M4E, havendo uma inibição de 83,50 % com a adição de 100  $\mu\text{M}$  ao meio exterior, enquanto na alface DP esta percentagem de inibição é de apenas 68,03 % com 150  $\mu\text{M}$  de Ni.

O efeito do Zn, é muito semelhante ao que ocorre com a presença de Ni. O crescimento da raiz de alface M4E é inibido em 51,69 %, com a adição de 100  $\mu\text{M}$  de Zn, sendo apenas obtido um efeito semelhante para a alface DP com a concentração mais elevada de Zn em estudo (63,01 %).

Por fim, realiza-se uma análise classificatória com os resultados obtidos para a planta jovem (2 dias) e adulta (27 dias) exposta a cada uma das concentrações de EPTs para cada cultivar (**Figura 4.58**).



**Figura 4.58** - Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos das duas cultivares de alface (DP e M4E), expostos às diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni ou Zn, ao fim de 2 (a,c) e 27 dias (b,d) de tratamento. Estas duas componentes explicam 77,89 % (a), 78,16 % (b), 79,10 % (c) e 78,56 % (d) da variabilidade.

Os indivíduos estão apresentados com base na concentração de cada metal aplicado e com a coloração correspondente ao EPT representado na legenda.

A análise classificatória é realizada com os resultados obtidos para a quantidade acumulada de elemento químico contaminante ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) e com as massas frescas (g), ambos obtidos para a parte aérea e raiz das duas cultivares de alface.

Através desta análise classificatória o que se destaca é uma classe completamente individualizada com os indivíduos contaminados com Pb (**Figura 4.58-a,b,d**). Estes resultados demonstram que estes indivíduos são diferentes de todos os outros e que se encontram claramente separados dos indivíduos controlo correspondentes. A exceção ocorre nas plantas jovens de M4E, onde não existe uma classe completamente individualizada, mas os indivíduos contaminados com chumbo estão agrupados numa nuvem de pontos ligeiramente deslocada dos outros indivíduos (**Figura 4.58-c**). Estes resultados confirmam a análise dos resultados realizada anteriormente, e mostra que o Pb é o elemento que menos efeito tem nas duas cultivares de alface, para as condições de ensaio utilizadas.



Nas plantas jovens de ambas as cultivares, existe sobreposição de indivíduos nas outras duas classes, não se conseguindo fazer nenhuma interpretação conclusiva dos dados (**Figura 4.58-a,c**). Na planta adulta DP, existe sobreposição dos indivíduos nas restantes classes. No entanto, é possível verificar que numa classe predominam indivíduos contaminados com Cu e Cr, que são os EPTs que têm maior efeito nesta cultivar (com base nos resultados obtidos nos valores de IT e  $LC_{50}$ ) (**Figura 4.58-b**). Na planta adulta M4E, é possível observar duas classes sobrepostas: uma classe onde predominam os indivíduos contaminados com Cr, Cd, Ni e Zn que são os EPTs que têm maior efeito na planta (com base nos resultados obtidos nos valores de IT e  $LC_{50}$ ), e outra classe onde existe maioritariamente indivíduos contaminados com Cu e controlo (**Figura 4.58-d**).

#### *Conclusões intercalares*

De um modo geral, a planta jovem demonstra ser mais tolerante à presença destes EPTs do que a planta adulta, o que reflete um menor efeito destes elementos na fase inicial de desenvolvimento. Os valores de  $LC_{50}$  obtidos também refletem que a raiz é muito mais afetada na planta adulta, relativamente à planta jovem, o que indica uma baixa inibição do crescimento da raiz na fase inicial de crescimento.

A parte aérea, das plantas de alface, demonstra ser menos tolerante à presença de EPTs que a raiz para todos os metais em estudo e para as duas cultivares de alface. A cultivar M4E apresenta índices de tolerância mais baixos na presença de Cd, Ni e Zn, por comparação com a cultivar DP, que demonstra ser menos tolerante à exposição com Cu e Pb. O Cr é o elemento que apresenta valores de IT menores para ambas as cultivares.

A interpretação dos resultados obtidos para o  $LC_{50}$  indica que a presença de Cr tem um efeito inibitório maior na raiz e o Pb tem o efeito oposto, para as duas cultivares em estudo. Na alface DP a exposição ao Cu tem um maior efeito na raiz, enquanto na alface M4E é a presença de Cd, Ni e Zn que produzem efeitos inibitórios superiores neste órgão.

A análise classificatória destaca uma classe completamente individualizada com os indivíduos contaminados com Pb, comprovando que estes indivíduos são totalmente diferentes de todos os outros.

Na planta adulta, a interpretação dos resultados obtidos na análise classificatória, IT e  $LC_{50}$  permitem inferir que o Cr é o EPT que provoca maior toxicidade nas duas cultivares de alface e o Pb tem o efeito contrário. O Cu e o Ni são os elementos que promovem um maior efeito tóxico na alface DP, e o Cd, Ni e Zn na alface M4E.



#### 4.6. Conclusões

Na **Tabela 4.7** encontra-se um resumo para se avaliar a acumulação de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni ou Zn nas duas cultivares de alface, tendo por base os resultados obtidos para os parâmetros vegetativos (diminuição percentual da biomassa), o teor de água presente nos tecidos, a percentagem de EPT translocada para a parte aérea, o índice de tolerância, assim como a caracterização realizada para a acumulação de cada EPT.

Regra geral, com o decorrer do ensaio e com o aumento de concentrações crescentes de EPT, há uma diminuição gradual nas massas frescas da parte aérea e da raiz nas duas cultivares de alface, resultado de uma maior acumulação do EPT presente em solução nutritiva.

A parte aérea é o órgão mais afetado em termos de biomassa para as duas cultivares de alface exposta a todos os EPTs, sendo mais evidente para a exposição com Cr e com menor efeito na presença de Pb. Esta diminuição muito provavelmente está relacionada com a interferência dos EPTs com a absorção de água pela planta e, no caso do Cd, por interferir com outro(s) elemento(s) que são essenciais para o crescimento normal da planta.

A planta de alface poderá ser uma boa bioindicadora dos níveis de elementos metálicos presentes, uma vez que manifesta claramente os seus efeitos adversos. Tempos de exposição mais longos e concentrações mais elevadas permitem verificar um maior número de efeitos negativos de cada EPT. Os sintomas mais comuns são o aparecimento de cloroses, necroses, folhas murchas e a diminuição do tamanho das folhas. Na raiz também há uma redução gradual do seu crescimento, que é acompanhada por um acastanhamento e aparecimento de ramificações com extremidades negras. Estes efeitos são notórios na presença de Cd, Cu, Ni e Zn. Apenas o Pb não provoca um efeito muito visível na parte aérea da planta. O Cr teve um efeito bastante acentuado na alface para esta gama de concentrações estudada.

A acumulação de EPT é bastante superior na raiz por comparação com a concentração presente na parte aérea nas duas cultivares. Se considerarmos a situação de maior contaminação (50  $\mu\text{M}$  Cd; 50  $\mu\text{M}$  Cu; 150  $\mu\text{M}$  Cr; 150  $\mu\text{M}$  Pb; 200  $\mu\text{M}$  Ni; 200  $\mu\text{M}$  Zn) durante o período mais longo (27 dias), a alface apresenta uma elevada acumulação de EPTs na raiz. O Cu, Cr e Pb são os elementos que mais dificilmente são translocados para a parte aérea da planta, ao contrário do que se verifica para o Cd, Ni e Zn.





Tabela 4.7 – Resumo da avaliação da acumulação de Cd, Cr, Pb, Cu, Ni ou Zn em plantas de alfaca.

Variável	Cultivar	Cd	Cr	Pb	Cu	Ni	Zn
Massa fresca (parte aérea)	DP	≥ 10 µM *81,6 %	≥ 50 µM *97,5%	≥ 150 µM ⊙ 50, 75, 100 µM (27 dias) *67,6 %	≥ 25 µM *88,1 %	≥ 100 µM *94,7 %	≥ 125 µM *79,5 %
	M4E	≥ 10 µM *87,1 %	≥ 50 µM *98,6 %	s/d ⊙ 50, 75, 100 µM (27 dias) *41,9 %	≥ 35 µM *87,7 %	≥ 100 µM *97,4 %	≥ 125 µM *94,4 %
Massa fresca (raiz)	DP	≥ 25 µM *69,6 %	≥ 50 µM *95,7 %	s/d ⊙ 50, 75 µM (27 dias) *8,1 %	≥ 35 µM ⊙ 10 µM (13 e 20 dias) *79,4 %	≥ 125 µM ⊙ 50 µM (27 dias) *87,6 %	≥ 150 µM *63,0 %
	M4E	≥ 5 µM *76,3 %	≥ 50 µM *96,4 %	s/d *3,9 %	≥ 50 µM *72,9 %	≥ 100 µM *93,0 %	≥ 100 µM ⊙ 100 µM (6 dias) *93,2 %
Teor de água	DP	sem efeito	↓↓ parte aérea ↓ raiz	↓↓ parte aérea ↓ raiz	↓↓ parte aérea ↓ raiz	↓↓ parte aérea ↓ raiz	↓ parte aérea sem efeito raiz
	M4E	sem efeito	↓↓ parte aérea ↓ raiz	↓ parte aérea ↓ raiz	↓ parte aérea ↓ raiz	↓↓ parte aérea ↓ raiz	↓↓ parte aérea ↓ raiz
[EPT]	DP	parte aérea: 488,32±29,89 raiz: 1458,4±132,4	parte aérea: 393,38±30,14 raiz: 12822,9±1501,3	parte aérea: 502,78±55,95 raiz: 48942,3±1867,3	parte aérea: 65,90±5,61 raiz: 1764,5±233,4	parte aérea: 364,52±6,86 raiz: 2001,4±151,3	parte aérea: 1014,78±34,10 raiz: 5310,9±493,0
	M4E	parte aérea: 560,74±44,94 raiz: 1723,1±100,8	parte aérea: 445,45±37,84 raiz: 15267,6±220,4	parte aérea: 340,06±32,80 raiz: 41458,0±709,1	parte aérea: 31,49±0,66 raiz: 1607,7±174,6	parte aérea: 529,88±16,59 raiz: 2677,8±269,6	parte aérea: 1691,11±64,22 raiz: 11438,3±1058,4
Acumulação	DP			parte aérea: linear raiz: hiperbólico			parte aérea: linear raiz: hiperbólico
	M4E	hiperbólico	polinomial		linear	hiperbólico	parte aérea: linear raiz: polinomial
% translocação (parte aérea)	DP	5 µM: 26,9-51,9 %; 50 µM: 33,5-44,6 %	50 µM: 1,8-2,8 % 150 µM: 2,0-3,7 %	50 µM: 0,2-0,7 % 150 µM: 0,3-1,0 %	10 µM: 4,4-8,1 % 50 µM: 2,5-3,7 %	50 µM: 10,7-14,1 % 200 µM: 15,3-20,5 %	50 µM: 22,1-31,4 % 200 µM: 17,8-21,6 %
	M4E	5 µM: 27,1-42,3 % 50 µM: 32,5-43,6 %	50 µM: 1,5-3,7 % 150 µM: 1,4-3,8 %	50 µM: 2,6-6,6 % 150 µM: 3,0-18,2 %	10 µM: 4,5-5,5 % 50 µM: 1,7-2,2 %	50 µM: 14,8-30,0 % 200 µM: 17,0-22,7 %	50 µM: 20,1-26,2 % 200 µM: 14,8-20,2 %
IT	DP	parte aérea: 18,4 % raiz: 30,4 %	parte aérea: 2,5 % raiz: 4,3 %	parte aérea: 32,4 % raiz: 91,9 %	parte aérea: 11,9 % raiz: 20,6 %	parte aérea: 5,3 % raiz: 12,4 %	parte aérea: 20,5 % raiz: 37,0 %
	M4E	parte aérea: 12,9 % raiz: 23,7 %	parte aérea: 1,4 % raiz: 3,6 %	parte aérea: 58,1 % raiz: 96,1 %	parte aérea: 12,3 % raiz: 27,1 %	parte aérea: 2,6 % raiz: 7,0 %	parte aérea: 5,6 % raiz: 6,8 %
Global	DP: Cr > Cd > Pb (elementos não essenciais), Ni > Cu > Zn (elementos essenciais)						
	M4E: Cr > Cd > Pb (elementos não essenciais), Ni > Zn > Cu (elementos essenciais)						

Legenda: os valores de concentração de cada EPT colocados na massa fresca da parte aérea e raiz dizem respeito aos valores para os quais existe uma diminuição em mais de 50 % da biomassa da parte aérea e raiz, comparativamente ao controlo; s/d indica sem diferenças significativas; ⊙ indica estímulo do crescimento, em relação ao controlo; os valores de [EPT] e IT referem-se à concentração mais elevada de EPT aplicada durante o período mais longo (27 dias); \*são valores relativos à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e raiz no caso de maior toxicidade ([EPT] mais elevada, 27 dias).



Esta acumulação preferencial nas raízes deve-se, presumivelmente, porque após ser absorvido pela raiz, o EPT para ser transportado e imobilizado nos vacúolos, liga-se a moléculas orgânicas ou quelatos ou fica adsorvido às paredes celulares, prevenindo a sua translocação para a parte aérea.

O modo de acumulação de cada EPT difere com o tipo de EPT e também pode ser diferente conforme o órgão da planta (Pb, Zn) e cultivar de alface (Zn).

A acumulação de Cd (parte aérea e raiz) apresenta um comportamento hiperbólico. Este comportamento indica que à medida que a concentração de Cd no meio aumenta existe uma tendência para a estabilização de Cd na planta. Os parâmetros obtidos ( $K_{Cd}$  e  $C_{máx}$ ) demonstram que as duas cultivares de alface têm o mesmo comportamento hiperbólico na acumulação de Cd, podendo evidenciar que a alface tem um comportamento de planta acumuladora e, possivelmente, possui mecanismos de destoxificação que lhe permite acumular estas elevadas quantidades de Cd nos seus tecidos.

A acumulação de Cr (parte aérea e raiz) apresenta um ajuste razoável ao modelo polinomial, evidenciando que as duas cultivares de alface têm um comportamento de planta excludora de Cr. Este comportamento indica que no início existem mecanismos que fazem um efeito barreira à entrada de Cr na planta, mas à medida que a concentração de Cr disponível em solução aumenta deixa de haver regulação dos mecanismos de entrada e a acumulação aumenta de forma considerável.

A acumulação de Cu (parte aérea e raiz) das duas cultivares de alface apresenta um comportamento linear, o que significa que existe uma proporcionalidade direta entre os valores de Cu absorvidos e os valores de Cu presentes em solução nutritiva.

As plantas de alface acumulam uma elevada concentração de Pb nas raízes relativamente à parte aérea, traduzindo-se num comportamento de acumulação de Pb completamente diferente para cada órgão da planta. A acumulação de Pb na parte aérea das duas cultivares de alface apresenta um ajuste razoável ao modelo linear enquanto que na raiz, a acumulação de Pb apresenta um comportamento hiperbólico. É esta acumulação preferencial na raiz que limita a translocação de Pb para a parte aérea, onde os valores percentuais de translocação são baixos.

Na acumulação de Ni (parte aérea e raiz), os parâmetros obtidos ( $K_{Ni}$  e  $C_{máx}$ ) indicam que ambas apresentam um comportamento hiperbólico, para as duas cultivares de alface. Estas plantas apresentam um comportamento de acumuladoras, uma vez que, possivelmente,



possuem mecanismos de destoxificação que lhes proporciona acumular elevadas quantidades de Ni.

A acumulação de Zn na parte aérea das duas cultivares apresenta um comportamento linear. Contudo, as raízes das duas cultivares de alface apresentam um comportamento diferente. Os parâmetros obtidos ( $K_{Zn}$  e  $C_{máx}$ ) indicam que a raiz da alface DP apresenta um comportamento hiperbólico na acumulação de Zn, o que pressupõe mecanismos de destoxificação eficazes, que permitem à planta acumular estas quantidades elevadas de Zn. A raiz da alface M4E apresenta um comportamento polinomial, este comportamento indica que a alface M4E tem um comportamento de planta exclusora de Zn. É possível verificar que existem diferenças na quantidade de Zn acumulada pela raiz das duas cultivares, o que está de acordo com o comportamento de acumulação observado. No caso, da exposição com Zn, as folhas acumulam elevadas quantidades deste elemento nos seus tecidos, comparativamente com todos os outros EPTs estudados, indicando que o Zn é bastante móvel na planta.

No caso do Pb, apesar de não se observarem efeitos visíveis de toxicidade, a planta acumula uma quantidade significativa deste elemento, tanto na raiz como na parte aérea. O Cr, apesar de ser pouco translocado para a parte aérea tal como o Pb, teve um efeito muito mais significativo na planta, uma vez que as concentrações aplicadas no meio foram idênticas para ambos os elementos. O Zn é o elemento que mais é acumulado na parte aérea, apesar do efeito de outros EPTs, como o Cr, Ni ou Cd também serem visualmente muito significativos na planta. Isto poderá estar relacionado com o modo como a planta responde ao stresse induzido por cada metal, e que irá ser estudada no **Capítulo V**. O Cu, devido a acumular menores quantidades na parte aérea relativamente aos outros EPTs, não irá ser estudado no próximo Capítulo.

Relativamente às diferenças entre cultivares, não existiram grandes diferenças em relação aos teores acumulados de Cd, Cr e Cu (neste último caso, apenas para as raízes), entre as duas cultivares, na parte aérea e na raiz. Verifica-se que a alface DP acumula mais Pb, tanto na parte aérea como nas raízes, e mais Cu na parte aérea. A alface M4E acumula mais Ni e Zn em ambas as partes da planta.

O modo de acumulação da planta e, por consequência, a manifestação dos efeitos visíveis de toxicidade depende do estado de desenvolvimento da planta, do órgão da planta, do tipo de EPT, das concentrações escolhidas do EPT em solução nutritiva e do tempo de exposição.



De um modo geral, a planta jovem demonstra ser mais tolerante à presença destes EPTs do que a planta adulta, o que reflete um menor efeito dos EPTs nos parâmetros estudados na fase inicial de desenvolvimento. Na planta adulta, a interpretação dos resultados obtidos na análise classificatória, IT e  $LC_{50}$  permitem inferir que o Cr é o EPT que provoca maior toxicidade nas duas cultivares de alface e o Pb menor. Na alface DP, o Cu e o Ni são os elementos que promovem um maior efeito tóxico, enquanto na alface M4E, esse efeito observa-se com o Ni e Zn. O efeito de cada EPT pode ser descrito pela seguinte ordem de toxicidade para os elementos não essenciais  $Cr > Cd > Pb$  (alface DP, M4E), e para os elementos essenciais:  $Ni > Cu > Zn$  (alface DP) e  $Ni > Zn > Cu$  (alface M4E). É importante referir que a classificação obtida no presente estudo depende das condições de ensaio escolhidas.

A alface M4E demonstra ser a cultivar menos tolerante à presença destes EPTs, dado que acumula uma quantidade superior de EPTs (Cd, Cr, Ni, Zn) nos seus tecidos e apresenta um efeito mais acentuado de diminuição da biomassa. A alface M4E acumula uma menor quantidade de Pb tanto na parte aérea como na raiz, embora esta cultivar apresente uma maior capacidade de translocação de Pb para a parte superior da planta. Os valores de IT e  $LC_{50}$  também permitem verificar que a alface M4E é, efetivamente, muito mais afetada pela presença destes EPTs, que a cultivar DP. Isto indica que poderá existir uma resposta metabólica associada a um metabolismo de tolerância específico e que poder estar relacionado com a presença de antocianinas nesta cultivar.

Apesar de a inibição do crescimento da planta ser um importante indicador de toxicidade, este parâmetro é uma consequência das alterações bioquímicas resultantes de uma resposta específica da planta ao stresse. Neste sentido, existe a necessidade de se estudar a resposta metabólica da planta para se identificar quais os mecanismos de resposta que permitem suportar estas elevadas concentrações de EPTs, tanto na planta jovem como adulta, o que irá ser realizado no **Capítulo V**.



#### 4.7 Referências Bibliográficas

- Ahmad, M., Wahid, A., Ahmad, S. S., Butt, Z. A., Tariq, M. (2011). Ecophysiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) to hexavalent chromium. *Pak. J. Bot.* **43**, 2853–2859.
- Akinci, I. E., Akinci, S., Yilmaz, K. (2010). Response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead toxicity: growth, element uptake, chlorophyll and water content. *Afr. J. Agric. Res.* **5**.
- Alam, M. M., Hayat, S., Ali, B., Ahmad, A. (2007). Effect of 28-homobrassinolide treatment on nickel toxicity in *Brassica juncea*. *Photosynthetica* **45**, 139-142.
- Alaoui-Sosse, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M. L., Epron, D., Badot, P. M. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science* **166**, 1213-1218.
- Ali, B., Gill, R. A., Yang, S., Gill, M. B., Farooq, M. A., Liu, D., Daud, M. K., Ali, S., Zhou, W. (2015). Regulation of Cadmium-Induced Proteomic and Metabolic Changes by 5-Aminolevulinic Acid in Leaves of *Brassica napus* L. *PloS one* **10**, e0123328-e0123328.
- Alkhatib, R., Bsoul, E., Blom, D. A., Ghoshroy, K., Creamer, R., Ghoshroy, S. (2013). Microscopic analysis of lead accumulation in tobacco (*Nicotiana tabacum* var. Turkish) roots and leaves. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* **1**, 57–62.
- Alloway, B. J. (2004). Contamination of soils in domestic gardens and allotments: a brief overview. *Land Contamination & Reclamation* **12**, 179-187.
- Alloway, B. J. (2013). Heavy Metals and Metalloids as Micronutrients for Plants and Animals. In "Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability" (B. J. Alloway, ed.), pp. 195-209. Springer Netherlands, Dordrecht.
- An, Y. (2004). Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environmental Pollution* **127**, 21–26.
- Appenroth, K. J. (2010). Definition of “heavy metals” and their role in biological systems. *Soil heavy metals*, 19–29.
- Assareh, M. H., Shariat, A., Ghamari-Zare, A. (2008). Seedling response of three Eucalyptus species to copper and zinc toxic concentrations. *Caspian Journal of Environmental Sciences* **6**, 97–103.
- Bagur-González, M. G., Estepa-Molina, C., Martín-Peinado, F., Morales-Ruano, S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of Soils and Sediments* **11**, 281-289.
- Bah, A. M., Dai, H., Zhao, J., Sun, H., Cao, F., Zhang, G., Wu, F. (2011). Effects of Cadmium, Chromium and Lead on Growth, Metal Uptake and Antioxidative Capacity in *Typha angustifolia*. *Biological Trace Element Research* **142**, 77-92.
- Barcelo, J., Poschenrieder, C. (1990). Plant Water Relations as Affected by Heavy-Metal Stress - a Review. *Journal of Plant Nutrition* **13**, 1-37.
- Barrameda-Medina, Y., Montesinos-Pereira, D., Romero, L., Ruiz, J. M., Blasco, B. (2014). Comparative study of the toxic effect of Zn in *Lactuca sativa* and *Brassica oleracea* plants: I. Growth, distribution, and accumulation of Zn, and metabolism of carboxylates. *Environmental and Experimental Botany* **107**, 98-104.



- Baryl, A., Carrier, P., Franck, F., Coulomb, C., Sahut, C., Havaux, M. (2001). Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* **212**, 696-709.
- Bashmakov, D. I., Lukatkin, A. S., Prasad, M. N. V. (2006). Temperate weeds in Russia: sentinels for monitoring trace element pollution and possible application in phytoremediation. In: Trace elements application of quantitative fluorescence and absorption-edge computed microtomography to image metal compartmentalization in *Alyssum murale*. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 2210–2218.
- Ben Ghnaya, A., Charles, G., Hourmant, A., Ben Hamida, J., Branchard, M. (2009). Physiological behaviour of four rapeseed cultivar (*Brassica napus* L.) submitted to metal stress. *Comptes Rendus Biologies* **332**, 363-370.
- Bernardini, A., Salvatori, E., Guerrini, V., Fusaro, L., Canepari, S., Manes, F. (2016). Effects of high Zn and Pb concentrations on *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex. Steudel: Photosynthetic performance and metal accumulation capacity under controlled conditions. *International Journal of Phytoremediation* **18**, 16-24.
- Blasco, B., Graham, N. S., Broadley, M. R. (2015). Antioxidant response and carboxylate metabolism in *Brassica rapa* exposed to different external Zn, Ca, and Mg supply. *Journal of Plant Physiology* **176**, 16-24.
- Boisvert, S., Joly, D., Leclerc, S., Govindachary, S., Harnois, J., Carpentier, R. (2007). Inhibition of the oxygen-evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel. *BioMetals* **20**, 879–889.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist* **173**, 677-702.
- Burkhead, J. L., Reynolds, K. A. G., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Pilon, M. (2009). Copper homeostasis. *New Phytologist* **182**, 799-816.
- Cailliatte, R., Schikora, A., Briat, J. F., Mari, S., Curie, C. (2010). High affinity manganese uptake by the metal transporter nramp1 is essential for Arabidopsis Growth in Low Manganese Conditions. *Plant Cell* **22**, 904–917.
- Cambrollé, J., García, J. L., Figueroa, M. E., Cantos, M. (2015). Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. *Chemosphere* **120**, 171-178.
- Cenkci, S., Cigerci, I. H., Yildiz, M., Özay, C., Bozdog, A., Terzi, H. (2010). Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. . *Environ Exp Bot* **67**, 467–473.
- Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J. C., Moreno-Sanchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *Fems Microbiology Reviews* **25**, 335-347.
- Chakraborty, R., Karmakar, S., Mukherjee, S., Kumar, S. (2014). Kinetic evaluation of chromium(VI) sorption by water lettuce (*Pistia*). *Water Science & Technology* **1**, 195-201.
- Charles, J., Sancey, B., Morin-Crini, N., Badot, P. M., Degiorgi, F., Trunfio, G., Crini, G. (2011). Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. . *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74**, 2057–2064.
- Chatterjee, J., Chatterjee, C. (2000). Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution* **109**, 69-74.
- Chen, C., Huang, D., Liu, J. (2009). Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects. *Clean* **37** 304–313.





- Cheng, T., Allen, H. E. (2001). Prediction of uptake of copper from solution by lettuce (*Lactuca sativa* Romance). *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 2544-2551.
- Cheruiyot, D., Boyd, R., Moar, W. (2013). Exploring Lower Limits of Plant Elemental Defense by Cobalt, Copper, Nickel, and Zinc. *J Chem Ecol* **39**, 666–674.
- Choppala, G., Saifullah, Bolan, N., Bibi, S., Iqbal, M., Rengel, Z., Kunhikrishnan, A., Ashwath, N., Ok, Y. S. (2014). Cellular Mechanisms in Higher Plants Governing Tolerance to Cadmium Toxicity. *Critical Reviews in Plant Sciences* **33**, 374-391.
- Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**, 475-486.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**, 1707-1719.
- Clemens, S., Aarts, M. G. M., Thomine, S., Verbruggen, N. (2013). Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science* **18**, 92-99.
- Clemens, S., Palmgren, M. G., Krämer, U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* **7**, 309-315.
- Colangelo, E. P., Guerinot, M. L. (2006). Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 322-330.
- Connolly, E. L., Fett, J. P., Guerinot, M. L. (2002). Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **14**, 1347–1357.
- Coolong, T. W., Randle, W. M. (2003). Zinc Concentration in Hydroponic Solution Culture Influences Zinc and Sulfur Accumulation in *Brassica rapa* L. *Journal of Plant Nutrition* **26**, 949–959.
- DalCorso, G., Manara, A., Furini, A. (2013). An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. *Metallomics* **5**, 1117-1132.
- DalCorso, G., Manara, A., Piasentin, S., Furini, A. (2014). Nutrient metal elements in plants. *Metallomics* **6**, 1770-1788.
- Dandan, L., Dongmei, Z., Peng, W., Nanyan, W., Xiangdong, Z. (2011). Subcellular Cd distribution and its correlation with antioxidant enzymatic activities in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Ecotoxicol Environ Saf* **74**, 874-81.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R. (2001). Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* **52**, 1101-1109.
- Dresler, S., Hanaka, A., Bednarek, W., Maksymiec, W. (2014). Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of *Zea mays* plants treated with cadmium and copper. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**, 1565-1575.
- Ebbs, S., Uchil, S. (2008). Cadmium and zinc induced chlorosis in Indian mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern] involves preferential loss of chlorophyll b. *Photosynthetica* **46**, 49-55.
- Ekmekci, Y., Tanyolac, D., Ayhan, B. (2008). Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *Journal of Plant Physiology* **165**, 600-611.
- Ent, A., Baker, A. M., Reeves, R., Pollard, A. J., Schat, H. (2013). Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant and Soil* **362**, 319-334.
- Espinoza-Quñones, F., Módenes, A., Costa, I., Jr., Palácio, S., Szymanski, N., Trigueros, D., Kroumov, A. D., Silva, E. (2009). Kinetics of Lead Bioaccumulation from a Hydroponic





- Medium by Aquatic Macrophytes *Pistia stratiotes*. *Water, Air, and Soil Pollution* **203**, 29-37.
- Eun, S. O., Youn, H. S., Lee, Y. (2000). Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* **110**, 357-365.
- Fazal, H., Tariq, A. (2015). A Mini Review on Lead (Pb) Toxicity in Plants. . *Journal of Biology and Life Science* **6**, 91-101.
- Feigl, G., Kumar, D., Lehotai, N., Tugyi, N., Molnár, Á., Ördög, A., Szepesi, Á., Gémes, K., Laskay, G., Erdei, L., Kolbert, Z. (2013). Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **94**, 179-189.
- Fernández, R., Fernández-Fuego, D., Bertrand, A., González, A. (2014). Strategies for Cd accumulation in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter: Role of the cell wall, non-protein thiols and organic acids. *Plant Physiology and Biochemistry* **78**, 63-70.
- Flora, S., Megha, M., Ashish, M. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research* **128**, 501-523.
- Fontes, R. L. F., Cox, F. R. (1995). Effects of sulfur supply on soybean plants exposed to zinc toxicity. *J. Plant Nutr.* **18**, 1893–1906.
- Fox, T. C., Guerinot, M. L. (1998). Molecular biology of cation transport in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 669-696.
- Fukao, Y., Ferjani, A., Tomioka, R., Nagasaki, N., Kurata, R., Nishimori, Y., Fujiwara, M., Maeshima, M. (2011). iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **155**, 1893–1907.
- Gajewska, E., Bernat, P., Długoński, J., Skłodowska, M. (2012). Effect of Nickel on Membrane Integrity, Lipid Peroxidation and Fatty Acid Composition in Wheat Seedlings. *Journal of Agronomy and Crop Science* **198**, 286-294.
- Gajewska, E., Skłodowska, M. (2008). Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: antioxidative reactions and proline accumulation. *Plant Growth Regulation* **54**, 179-188.
- Gajewska, E., Skłodowska, M. (2010). Differential effect of equal copper, cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf* **73**, 996-1003.
- Gajewska, E., Skłodowska, M. (2007). Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *BioMetals* **20**, 27–36.
- Gajewska, E., Skłodowska, M., Slaba, M., Mazur, J. (2006). Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum* **50**, 653-659.
- Gallego, S. M., Pena, L. B., Barcia, R. A., Azpilicueta, C. E., Lannone, M. F., Rosales, E. P., Zawoznik, M. S., Groppa, M. D., Benavides, M. P. (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* **83**, 33-46.
- Gardea-Torresdey, J. L., Peralta-Videa, J. R., Montes, M., de la Rosa, G., Corral-Diaz, B. (2004). Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bioresource Technology* **92**, 229-235.
- Ghnaya, T., Nouairi, I., Slama, I., Messedi, D., Grignon, C., Abdelly, C., Ghorbel, M. H. (2005). Cadmium effects on growth and mineral nutrition of two halophytes: *Sesuvium*



- portulacastrum and Mesembryanthemum crystallinum. *Journal of Plant Physiology* **162**, 1133-1140.
- Ghnaya, T., Zaier, H., Baioui, R., Sghaier, S., Lucchini, G., Sacchi, G. A., Lutts, S., Abdelly, C. (2013). Implication of organic acids in the long-distance transport and the accumulation of lead in *Sesuvium portulacastrum* and *Brassica juncea*. *Chemosphere* **90**, 1449-1454.
- Gill, R. A., Zang, L., Ali, B., Farooq, M. A., Cui, P., Yang, S., Ali, S., Zhou, W. (2015). Chromium-induced physio-chemical and ultrastructural changes in four cultivars of *Brassica napus* L. *Chemosphere* **120**, 154-64.
- Gill, S. S., Khan, N. A., Tuteja, N. (2012). Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.),. *Plant Sci.* **182** 112-120.
- Gitto, A., Fricke, W. (2018). Zinc treatment of hydroponically-grown barley (*H. vulgare*) plants causes a reduction in root and cell hydraulic conductivity and isoform-dependent decrease in aquaporin gene expression. *Physiologia Plantarum*, n/a-n/a.
- Gopal, R., Nautiyal, N. (2011). Phytotoxic Effects of Cadmium Exposure and Metal Accumulation in Sunflower. *Journal of Plant Nutrition* **34**, 1616-1624.
- Guo, J., Dai, X., Xu, W., Ma, M. (2008). Over expressing GSHI and As PCSI simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere* **72**, 1020–1026.
- Gupta, D. K., Nicoloso, F. T., Schetinger, M. R. C., Rossato, L. V., Huang, H. G., Srivastava, S., Yang, X. E. (2011). Lead induced responses of *Pfaffia glomerata*, an economically important Brazilian medicinal plant, under in vitro culture conditions. *Bull Environ Cont Toxicol* **86**, 272–277.
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1-11.
- Hall, J. L., Williams, L. E. (2003). Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2601-2613.
- Hänsch, R., Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 259-266.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M., Fujita, M. (2012). Exogenous Selenium Pretreatment Protects Rapeseed Seedlings from Cadmium-Induced Oxidative Stress by Upregulating Antioxidant Defense and Methylglyoxal Detoxification Systems. *Biological Trace Element Research* **149**, 248-261.
- Hayat, S., Khalique, G., Irfan, M., Wani, A. S., Tripathi, B. N., Ahmad, A. (2012). Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. *Protoplasma* **249**, 599-611.
- Haydon, M. J., Cobbett, C. S. (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist* **174**, 499-506.
- He, E., Qiu, H., Van Gestel, C. A. (2014). Modelling uptake and toxicity of nickel in solution to *Enchytraeus crypticus* with biotic ligand model theory. *Environ Pollut* **188**, 17-26.
- Iori, V., Pietrini, F., Cheremisina, A., Shevyakova, N., Radyukina, N., Kuznetsov, V., Zacchini, M. (2013). Growth Responses, Metal Accumulation and Phytoremoval Capability in *Amaranthus* Plants Exposed to Nickel Under Hydroponics. *Water Air Soil Pollut* **224**, 1450:1460.



- Irfan, M., Hayat, S., Ahmad, A., Alyemeni, M. N. (2013). Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Saudi Journal of Biological Sciences* **20**, 1-10.
- Ishtiaq, S., Mahmood, S. (2011). Phytotoxicity of nickel and its accumulation in tissues of three *Vigna* species at their early growth stages. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **84**, 223–228.
- Islam, E., Yang, X., Li, T., Liu, D., Jin, X., Meng, F. (2007). Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials* **147**, 806–816.
- ISO (1993). Soil quality—determination of the effects of pollutants on soil flora—part 1: methods for the measurement of inhibition of root growth. (ISO—International organization for standardization, ed.), pp. 1-9, Genève.
- Ivanova, E. M., Kholodova, V. P., Kuznetsov, V. V. (2010). Biological effects of high copper and zinc concentrations and their interaction in rapeseed plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **57**, 806-814.
- January, M., Cutright, T., Keulen, H., Wei, R. (2008). Hydroponic phytoremediation of Cd, Cr, Ni, As, and Fe: Can *Helianthus annuus* hyperaccumulate multiple heavy metals? *Chemosphere* **70** 531–537.
- Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* **68**, 167–182.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S. (2009). Cadmium and lead-induced changes in lipid peroxidation, antioxidative enzymes and metal accumulation in *Brassica juncea* L. at three different growth stages. *Archives of Agronomy and Soil Science* **55**, 395-405.
- Khan, M. R., Khan, M. M. (2010). Effect of varying concentration of Nickel and Cobalt on the plant growth and yield of Chickpea. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **4**, 1036–1046.
- Kim, D., Gustin, J. L., Lahner, B., Persans, M. W., Baek, D., Yun, D.-J., Salt, D. E. (2004). The plant CDF family member TgMTP1 from the Ni /Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Plant Journal* **39**, 237–251.
- Kim, Y. Y., Yang, Y. Y., Lee, Y. (2002). Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiologia Plantarum* **116**, 368-372.
- Kopittke, P. M., Asher, C. J., Kopittke, R. A., Menzies, N. W. (2007). Toxic effects of Pb<sup>2+</sup> on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environ Pollut* **150**, 280-7.
- Kramer, U., Talke, I. N., Hanikenne, M. (2007). Transition metal transport. *FEBS Letters* **581**, 2263–2272.
- Krzesłowska, M., Lenartowska, M., Samardakiewicz, S., Bilski, H., Wózný, A. (2010). Lead deposited in the cell wall of *Funaria hygrometrica* protonemata is not stable—a remobilization can occur. *Environ. Pollut.* **158**, 325–338.
- Kumar, A., Maiti, S. K. (2013). Availability of chromium, nickel and other associated heavy metals of ultramafic and serpentine soil/rock and in plants. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering* **3**, 256–268.
- Kumar, H., Sharma, D., Kumar, V. (2012). Nickel-induced oxidative stress and role of antioxidant defence in Barley roots and leaves. *International Journal of Environmental Biology* **2**, 121-128.
- Kumar, P., Roupael, Y., Cardarelli, M., Colla, G. (2015). Effect of nickel and grafting combination on yield, fruit quality, antioxidative enzyme activities, lipid peroxidation, and mineral composition of tomato. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **178**, 848-860.



- Küpper, H., Leitenmaier, B. (2013). Cadmium-Accumulating Plants. In "Cadmium: From Toxicity to Essentiality" (A. Sigel, H. Sigel and R. K. O. Sigel, eds.), Vol. 11, pp. 373-393. Springer Netherlands.
- Kupper, H., Setlik, I., Setlikova, E., Ferimazova, N., Spiller, M., Kupper, F. C. (2003). Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda*. *Functional Plant Biology* **30**, 1187-1196.
- Lamhamdi, M., Bakrim, A., Aarab, A., Lafont, R., Sayah, F. (2011). Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth. *C R Biol* **334**, 118-26.
- Lamhamdi, M., El Galiou, O., Bakrim, A., Nóvoa-Muñoz, J. C., Arias-Estévez, M., Aarab, A., Lafont, R. (2013). Effect of lead stress on mineral content and growth of wheat (*Triticum aestivum*) and spinach (*Spinacia oleracea*) seedlings. *Saudi Journal of Biological Sciences* **20**, 29-36.
- Leitenmaier, B., Witt, A., Witzke, A., Stemke, A., Meyer-Klaucke, W., Kroneck, P. M. H., Küpper, H. (2011). Biochemical and biophysical characterisation yields insights into the mechanism of a Cd/Zn transporting ATPase purified from the hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1808**, 2591-2599.
- Liao, Y. C., Chang Chien, S. W., Wang, M. C., Shen, Y., Hung, P. L., Das, B. (2006). Effect of transpiration on Pb uptake by lettuce and on water soluble low molecular weight organic acids in rhizosphere. *Chemosphere* **65** 343–351.
- Lin, Y.-F., Aarts, M. M. (2012). The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 3187-3206.
- Linger, P., Ostwald, A., Haensler, J. (2005). Cannabis sativa L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis. *Biologia Plantarum* **49**, 567-576.
- Liu, D., Jiang, W., Liu, C., Xin, C., Hou, W. (2000). Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)]. *Bioresource Technology* **71** 273-277.
- Liu, D., Zou, J., Meng, Q., Zou, J., Jiang, W. (2009). Uptake and accumulation and oxidative stress in garlic (*Allium sativum* L.) under lead phytotoxicity. *Ecotoxicology* **18**.
- Liu, D., Zou, J., Wang, M., Jiang, W. (2008). Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in *Amaranthus viridis* L. *Bioresour Technol* **99**, 2628-36.
- Liu, Y., Vijver, M. G., Peijnenburg, W. J. (2014). Impacts of major cations (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) and protons on toxicity predictions of nickel and cadmium to lettuce (*Lactuca sativa* L.) using exposure models. *Ecotoxicology* **23**, Issue 3, pp 385–395
- Llorens, N., Arola, L., Blade, C., Mas, A. (2000). Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*. *Plant Sci.* **160**, 159–163.
- Lombardi, L., Sebastiani, L. (2005). Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Science* **168**, 797-802.
- López-Millán, A.-F., Sagardoy, R., Solanas, M., Abadía, A., Abadía, J. (2009). Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. *Environmental and Experimental Botany* **65**, 376-385.
- Lugon-Moulin, N., Zhang, M., Gadani, F., Rossi, L., Koller, D., Krauss, M., Wagner, G. J. (2004). Critical review of the science and options for reducing cadmium in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and other plants. *Adv. Agronomy* **83** 111–180.



- Maestri, E., Marmioli, M., Visioli, G., Marmioli, N. (2010). Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental and Experimental Botany* **68**, 1-13.
- Małacka, A., Piechalak, A., Tomaszewska, B. (2009). Reactive oxygen species production and antioxidative defense system in pea root tissues treated with lead ions: the whole roots level. *Acta Physiologiae Plantarum* **31**, 1053–1063.
- Mallick, S., Sinam, G., Mishra, R. K., Sinha, S. (2010). Interactive effects of Cr and Fe treatments on plants growth, nutrition and oxidative status in *Zea mays* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **73**, 987–995.
- Martins, L., Mourato, M., Baptista, S., Reis, R., Carneiro, F., Almeida, A., Feveteiro, P., Cuypers, A. (2014). Response to oxidative stress induced by cadmium and copper in tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) engineered with the trehalose-6-phosphate synthase gene (AtTPS1). *Acta Physiologiae Plantarum* **36**, 755-765.
- Martins, L., Reis, R., Moreira, I., Pinto, F., Sales, J., Mourato, M. (2013). Antioxidative response of plants to oxidative stress induced by Cadmium. In "Cadmium - Characteristics, Sources of Exposure, Health and Environmental Effects" (M. Hasanuzzaman and M. Fujita, eds.), pp. 369. Nova Publishers, New York.
- Martins, L. L., Mourato, M. P., Cardoso, A. I., Pinto, A. P., Mota, A. M., Gonçalves, M. d. L. S., de Varennes, A. (2011). Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**, 1375-1383.
- McComb, J., Hentz, S., Miller, G. S., Begonia, M., Begonia, G. (2012). Effects of Lead on Plant Growth, Lead Accumulation and Phytochelatin Contents of Hydroponically-Grown *Sesbania Exaltata*. *World Environment* **2**, 38-43.
- Meagy, M. J., Eaton, T. E., Barker, A. V. (2016). Zinc accumulation in lettuce cultivars grown with organic or chemical based nutritional regimes. *Journal of Plant Nutrition* **39**, 743-748.
- Meharg, A. A. (1993). The Role of the Plasmalemma in Metal Tolerance in Angiosperms. *Physiologia Plantarum* **88**, 191-198.
- Michalska, M., Asp, H. (2001). Influence of Lead and Cadmium on Growth, Heavy Metal Uptake and Nutrient Concentration of Three Lettuce Cultivars Grown in Hydroponic Culture. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **32**, 571-583.
- Migeon, A., Blaudez, D., Wilkins, O., Montanini, B., Campbell, M. M., Richaud, P., Thomine, S., Chalot, M. (2010). Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 3763–3784.
- Migocka, M., Papierniak, A., Kosieradzka, A., Posyniak, E., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Biskup, R., Garbiec, A., Marchewka, T. (2015). Cucumber Metal Transport Protein CsMTP9 is a plasma membrane H<sup>+</sup>-coupled antiporter involved in the Mn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> efflux from root cells. *The Plant Journal*, n/a-n/a.
- Mills, R. F., Francini, A., da Rocha, P., Baccarini, P. J., Aylett, M., Krijger, G. C., Williams, L. E. (2005). The plant P-1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *Febs Letters* **579**, 783-791.
- Mizuno, T., Usui, K., Horie, K., Nosaka, S., Mizuno, N., Obata, H. (2005). Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni<sup>2+</sup>-transport abilities. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 793-801.





- Mohamed, A. A., Castagna, A., Ranieri, A., Sanità di Toppi, L. (2012). Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **57**, 15-22.
- Mohanpuria, P., Rana, N. K., Yadav, S. K. (2007). Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camella sinensis* (L.) O Kuntze. *Environ Toxicol* **22**, 368–374.
- Mohtadi, A., Ghaderian, S. M., Schat, H. (2013). The effect of EDDS and citrate on the uptake of lead in hydroponically grown *Matthiola flavida*. *Chemosphere* **93**, 986-989.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., Chalot, M. (2007). Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* **8**, 107.
- Monteiro, M. S., Santos, C., Soares, A. M. V. M., Mann, R. M. (2009). Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**, 811-818.
- Nali, C., Crocicchi, L., Lorenzini, G. (2004). Plants as indicators of urban air pollution (ozone and trace elements) in Pisa, Italy. *J Environ Monit* **6**, 636-45.
- Nematshahi, N., Lahouti, M., Ganjeali, A. (2012). Accumulation of chromium and its effect on growth of (*Allium cepa* cv. Hybrid). *European Journal of Experimental Biology* **2**, 969–974.
- Nouairi, I., Ben Ammar, W., Ben Youssef, N., Daoud, D. B., Ghorbal, M. H., Zarrouk, M. (2006). Comparative study of cadmium effects on membrane lipid composition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* leaves. *Plant Science* **170**, 511-519.
- OECD (2006). "No. 208 Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test," Paris.
- Oliveira, H. (2012). Chromium as an Environmental Pollutant: Insights on Induced Plant Toxicity. *Journal of Botany* **2012**, 8.
- Pandey, N., Sharma, C. P. (2002). Effect of heavy metals  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science* **163**, 753-758.
- Peralta-Videa, J. R., Lopez, M. L., Narayan, M., Saupe, G., Gardea-Torresdey, J. (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1665-77.
- Peralta, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E., Parsons, J. G. (2001). Uptake and Effects of Five Heavy Metals on Seed Germination and Plant Growth in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **66**, 727-734.
- Pesko, M., Kral'ova, K. (2012). CADMIUM, NICKEL AND MERCURY ACCUMULATION AND SOME PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSES OF HYDROPONICALLY CULTIVATED RAPESEED (*BRASSICA NAPUS* L.) PLANTS. *Fresenius Environmental Bulletin* **21**, 3675-3684.
- Pilon-Smits, E. A. H., Quinn, C. F., Tapken, W., Malagoli, M., Schiavon, M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 267-274.
- Pilon, M. (2011). Moving copper in plants. *New Phytologist* **192**, 305-307.
- Pilon, M., Cohu, C. M., Ravet, K., Abdel-Ghany, S. E., Gaymard, F. (2009). Essential transition metal homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 347-357.



- Pinto, E., Aguiar, A. A. R. M., Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2014). Influence of Soil Chemistry and Plant Physiology in the Phytoremediation of Cu, Mn, and Zn. *Critical Reviews in Plant Sciences* **33**, 351-373.
- Pinto, F. R., Mourato, M. P., Sales, J. R., Moreira, I. N., Martins, L. L. (2017). Oxidative stress response in spinach plants induced by cadmium. *Journal of Plant Nutrition* **40**, 268-276.
- Pollard, A. J., Reeves, R. D., Baker, A. J. M. (2014). Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Science* **217–218**, 8-17.
- Pourrut, B., Perchet, G., Silvestre, J., Cecchi, M., Guiresse, M., Pinelli, E. (2008). Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *J. Plant Physiol.* **165**, 571–579.
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., Pinelli, E. (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Rev Environ Contam Toxicol* **213**, 113-36.
- Prasad, M. N. V. (2004). "Heavy Metal Stress in Plants," Springer.
- Qing, X., Zhao, X., Hu, C., Wang, P., Zhang, Y., Zhang, X., Wang, P., Shi, H., Jia, F., Qu, C. (2015). Selenium alleviates chromium toxicity by preventing oxidative stress in cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*) leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **114**, 179-189.
- Qiu, B., Zeng, F., Cai, S., Wu, X., Haider, S. I., Wu, F., Zhang, G. (2013). Alleviation of chromium toxicity in rice seedlings by applying exogenous glutathione. *Journal of Plant Physiology* **170**, 772-779.
- Rahman, H., Sabreen, S., Alam, S., Kawai, S. (2005). Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition* **28**, 393-404.
- Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J. J., Gárate, A. (2002). Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd–Mn interaction. *Plant Science* **162**, 761-767.
- Rao, M., Sresty, T. (2000). Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science* **157** 113–128.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* **180**, 169-181.
- Reichman, S. M. (2002). "The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc."
- Rodriguez, E., Azevedo, R., Fernandes, P., Santos, C. (2011). Cr(VI) induces DNA damage, cell cycle arrest and polyploidization: a flow cytometric and comet assay study in *Pisum sativum*. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 1040–1047.
- Rucińska-Sobkowiak, R. (2016). Water relations in plants subjected to heavy metal stresses. *Acta Physiologiae Plantarum* **38**, 257.
- Sagardoy, R., Morales, F., López-Millán, A. F., Abadía, A., Abadía, J. (2009). Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biology* **11** 339–350.
- Samantary, S. (2002). Biochemical responses of Cr-tolerant and Cr-sensitive mung bean cultivars grown on varying levels of chromium. *Chemosphere* **47**, 1065-72.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C., del Rio, L. A. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2115-2126.
- Sanita di Toppi, L., Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* **41**, 105-130.





- Sbartai, H., Djebbar, M., Sbartai, I., Berrabbah, H. (2012). Bioaccumulation of cadmium and zinc in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Comptes Rendus Biologies* **335**, 585-593.
- Scoccianti, V., Bucchini, A. E., Iacobucci, M., Ruiz, K. B., Biondi, S. (2016). Oxidative stress and antioxidant responses to increasing concentrations of trivalent chromium in the Andean crop species *Chenopodium quinoa* Willd. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **133**, 25-35.
- Scoccianti, V., Crinelli, R., Tirillini, B., Mancinelli, V., Speranza, A. (2006). Uptake and toxicity of Cr(III) in celery seedlings. *Chemosphere* **64**, 1695-1703.
- Seregin, I. V., Kozhevnikova, A. D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **53**, 257-277.
- Seregin, I. V., Shpigun, L. K., Ivanov, V. B. (2004). Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots *Russ. J. Plant. Physiol.* **51**, 525–533.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International* **31**, 739-753.
- Sharma, P., Bhardwaj, R., Arora, N., Arora, H., Kumar, A. (2008). Effects of 28-homobrassinolide on nickel uptake, protein content and antioxidative defence system in *Brassica juncea*. *Biologia Plantarum* **52**, 767-770.
- Sharma, P., Dubey, R. S. (2005). Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* **17**, 35-52.
- Shaw, B. P., Sahu, S. K., Mishra, R. K. (2004). Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In "Heavy Metal Stress in Plants" (M. N. V. Prasad, ed.), pp. 84-126. Springer, Berlin.
- Siedlecka, A. (1995). Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **64**, 265-272.
- Singh, H., Mahajan, P., Kaur, S., Batish, D., Kohli, R. (2013). Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environmental Chemistry Letters* **11**, 229-254.
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., Prasad, S. M. (2016). Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Sinha, P., Dube, B. K., Srivastava, P., Chatterjee, C. (2006). Alteration in uptake and translocation of essential nutrients in cabbage by excess lead. *Chemosphere* **65**, 651-656.
- Sivasankar, R., Kalaiandhan, R., Vijayarangan, P. (2012). "Phytoremediating capability and nutrient status of four plant species under zinc stress. *International Journal of Research in Plant Science* **2**, 8–15.
- Smith, P., Boutin, C., Knopper, L. (2013). Vanadium Pentoxide Phytotoxicity: Effects of Species Selection and Nutrient Concentration. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **64**, 87-96.
- Srivastava, R. K., Pandey, P., Rajpoot, R., Rani, A., Dubey, R. S. (2014). Cadmium and lead interactive effects on oxidative stress and antioxidative responses in rice seedlings. *Protoplasma* **251**, 1047-65.
- Srivastava, S., Jain, R. (2011). In-situ monitoring of chromium cytotoxicity in sugarcane. *Journal of Environmental Biology* **32**, 759–763.
- Stritsis, C., Claassen, N. (2013). Cadmium uptake kinetics and plant factors of shoot Cd concentration. *Plant and Soil* **367**, 591-603.
- Sun, H., Wang, X., Shang, L., Zhou, Z., Wang, R. (2017). "Cadmium accumulation and its effects on nutrient uptake and photosynthetic performance in cucumber (*Cucumis sativus* L.)."



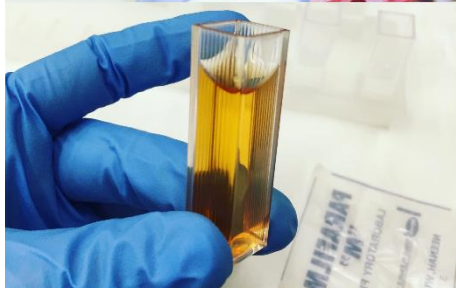
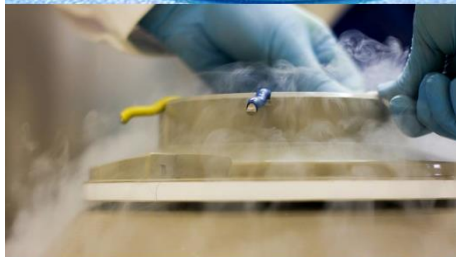
- Sun, S., Li, M., Zuo, J., Jiang, W., Liu, D. (2015). Cadmium effects on mineral accumulation, antioxidant defence system and gas exchange in cucumber *Zemdirbyste-Agriculture* **102**, 193–200.
- Sundaramoorthy, P., Chidambaram, A., Ganesh, K. S., Unnikannan, P., Baskaran, L. (2010). Chromium stress in paddy: (i) nutrient status of paddy under chromium stress; (ii) phytoremediation of chromium by aquatic and terrestrial weeds. *Comptes Rendus Biologies* **333**, 597–607.
- Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzalka, K., Prasad, M. N. V. (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 985-999.
- Tang, J., Xu, J., Wu, Y., Li, Y., Tang, Q. (2012). Effects of high concentration of chromium stress on physiological and biochemical characters and accumulation of chromium in tea plant (*Camellia sinensis* L.). *African Journal of Biotechnology* **11**, 2248-2255.
- Tanhan, P., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Chaiyarat, R. (2007). Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson. *Chemosphere* **68**, 323-329.
- Terzi, H., Yildiz, M. (2014). Variations in chromium tolerance and accumulation among canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **93**, 113-9.
- Tiwari, K. K., Singh, N. K., Rai, U. N. (2013). Chromium Phytotoxicity in Radish (*Raphanus sativus*): Effects on Metabolism and Nutrient Uptake. *Bull Environ Contam Toxicol* **91**, 339.
- Upadhyay, R. K., Panda, S. K. (2009). Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *C. R. Biologies* **332** 623–632.
- Valerio, M. E., García, J. F., Peinado, F. M. (2007). Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Science of the Total Environment* **378** 63–66.
- Vallano, D. M. I., Sparks, J. P. (2008). Quantifying foliar uptake of gaseous nitrogen dioxide using enriched foliar N values. *New Phytol.* **177**, 946–955.
- Vassilev, A., Lidon, F. C., Scotti, P., da Graca, M., Yordanov, I. (2004). Cadmium-induced changes in chloroplast lipids and photosystem activities in barley plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* **48**, 153-156.
- Vert, G., Barberon, M., Zelazny, E., Seguela, M., Briat, J. F., Curie, C. (2009). Arabidopsis IRT2 cooperates with the high-affinity iron uptake system to maintain iron homeostasis in root epidermal cells. *Planta* **229**, 1171–1179.
- Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M. L., Briata, J. F., Curie, C. (2002). IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**, 1223-1233.
- Vijayarengan, P., Mahalakshmi, G. (2013). Zinc toxicity in tomato plants. *World Applied Sciences Journal* **24**, 649–653.
- Vogel-Mikus, K., Drobne, D., Regvar, M. (2005). Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonization of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia *Environ. Pollut.* **133**, 233–242.
- Wagner, G. J. (1993). Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agronomy* **51** 173–212.
- Williams, L. E., Pittman, J. K., Hall, J. L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1465**, 104–126.



- Wintz, H., Fox, T., Wu, Y.-Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H.-S., Zhu, T., Vulpe, C. (2003). Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 47644–47653.
- Wojcik, M., Tukiendorf, A. (2004). Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul* **44**, 71–80.
- Wong, C. K. E., Christopher S. Cobbett (2009). HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **181**, 71-78.
- Wu, Q., Shigaki, T., Williams, K. A., Han, J.-S., Kim, C. K., Hirschi, K. D., Park, S. (2011). Expression of an *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter CAX1 variant in petunia enhances cadmium tolerance and accumulation. *Journal of Plant Physiology* **168**, 167-173.
- Wu, Z., McGrouther, K., Chen, D., Wu, W., Wang, H. (2013). Subcellular Distribution of Metals within *Brassica chinensis* L. in Response to Elevated Lead and Chromium Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**, 4715-4722.
- Wuana, R. A., Okieimen, F. E. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology* **2011**, 20.
- Xiong, Z., Zhao, F., Li, M. (2006). Lead toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr.: effect on nitrate assimilation and growth. *Environ. Toxicol.* **21**, 147–153.
- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* **76**, 167-179.
- Yang, L., Stulen, I., De Kok, L. J. (2006). Impact of sulfate nutrition on the utilization of atmospheric SO<sub>2</sub> as sulfur source for Chinese cabbage. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **169**, 529–534.
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* **17**, 145-156.
- Yruela, I. (2009). Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology* **36**, 409-430.
- Yurekli, F., Porgali, Z. B. (2006). The effects of excessive exposure to copper in bean plants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **48**, 7–13.
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Hayat, S., Ahmad, A. (2011). Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **86**, 1-17.
- Zaier, H., Mudarra, A., Kutscher, D., de la Campa, M. R. F., Abdelly, C., Sanz-Medel, A. (2010). Induced lead binding phytochelatins in *Brassica juncea* and *Sesuvium portulacastrum* investigated by orthogonal chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **671**, 48-54.
- Zayed, A., Lytle, C. M., Qian, J. H., Terry, N. (1998). Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta* **206**, 293–299.
- Zivkovic, J., Ražic, S., Arsenijevic, J., Maksimovic, Z. (2012). Heavy metal contents in *Veronica* species and soil from mountainous areas in Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society* **77**, 959–970.
- Zorrig, W., Rouached, A., Shahzad, Z., Abdelly, C., Davidian, J.-C., Berthomieu, P. (2010). Identification of three relationships linking cadmium accumulation to cadmium



tolerance and zinc and citrate accumulation in lettuce. *Journal of Plant Physiology* **167**, 1239-1247.

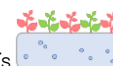


# Capítulo V

**Avaliação da  
resposta antioxidante  
induzida pela  
acumulação de EPTs**



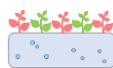




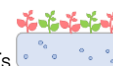
## Índice

Índice .....	289
Índice de Figuras.....	292
Índice de Tabelas.....	296
Resumo.....	298
Capítulo V - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE INDUZIDA PELA ACUMULAÇÃO DE EPTs .....	300
5.1. Objetivo .....	300
5.2. Introdução.....	300
5.2.1. O stresse oxidativo .....	301
5.2.2. As espécies reativas de oxigénio.....	302
5.2.3. Danos oxidativos causados pelas ROS .....	305
5.2.4. Respostas metabólicas da planta ao stresse oxidativo .....	307
5.2.4.1. Mecanismos de defesa não-enzimáticos.....	308
5.2.4.2. Mecanismos de defesa enzimáticos.....	313
5.2.5. Mecanismos de atuação dos metais pesados .....	319
5.2.5.1. Cádmio .....	320
5.2.5.2. Crómio .....	321
5.2.5.3. Chumbo .....	322
5.2.5.4. Níquel .....	324
5.2.5.5. Zinco .....	325
5.3. Material e métodos .....	326
5.3.1 Material Vegetal .....	326
5.3.2. Delineamento experimental .....	326
5.3.3. Instalação dos ensaios .....	328
5.3.4. Colheita, amostragem e conservação de amostras .....	329
5.3.5. Determinações analíticas .....	330
5.3.6 Tratamento estatístico .....	331
5.4. Resultados e Discussão.....	332
5.4.1. Cádmio.....	333
5.4.1.1. Planta jovem .....	333
5.4.1.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Cd.....	333
5.4.1.1.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos .....	334
5.4.1.1.3. Caracterização da resposta da planta jovem .....	337

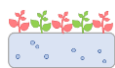




5.3.1.1.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta jovem face à toxicidade induzida por Cd .....	341
5.4.2.1. Planta adulta .....	342
5.4.2.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Cd .....	342
5.4.2.1.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos .....	344
5.4.2.1.3. Caracterização da resposta da planta adulta .....	347
5.3.2.1.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta adulta face à toxicidade induzida por Cd .....	355
5.4.2. Crómio .....	360
5.4.2.1. Planta jovem .....	360
5.4.2.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Cr .....	360
5.4.2.1.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos .....	361
5.4.2.1.3. Caracterização da resposta da planta jovem .....	364
5.4.2.1.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta jovem face à toxicidade induzida por Cr .....	368
5.4.2.2. Planta adulta .....	369
5.4.2.2.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Cr .....	369
5.4.2.2.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos .....	371
5.4.2.2.3. Caracterização da resposta da planta adulta .....	374
5.4.2.2.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta adulta face à toxicidade induzida por Cr .....	381
5.4.3. Chumbo .....	385
5.4.3.1. Planta jovem .....	385
5.4.3.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Pb .....	385
5.4.3.1.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos .....	387
5.4.3.1.3. Caracterização da resposta da planta jovem .....	389
5.4.3.1.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta jovem face à toxicidade induzida por Pb .....	394
5.4.3.2. Planta adulta .....	396
5.4.3.2.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Pb .....	396
5.4.3.2.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos .....	398
5.4.3.2.3. Caracterização da resposta da planta adulta .....	401

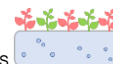


5.4.3.2.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta adulta face à toxicidade induzida por Pb .....	407
5.4.4. Níquel.....	412
5.4.4.1. Planta jovem .....	412
5.4.4.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Ni.....	412
5.4.4.1.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos .....	414
5.4.4.1.3. Caracterização da resposta da planta jovem .....	416
5.4.4.1.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta jovem face à toxicidade induzida por Ni .....	419
5.4.4.2. Planta adulta.....	420
5.4.4.2.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Ni.....	420
5.4.4.2.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos .....	421
5.4.4.2.3. Caracterização da resposta da planta adulta.....	424
5.4.4.2.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta adulta face à toxicidade induzida por Ni .....	430
5.4.5. Zinco .....	435
5.4.5.1. Planta jovem .....	435
5.4.5.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Zn .....	435
5.4.5.1.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos .....	436
5.4.5.1.3. Caracterização da resposta da planta jovem .....	438
5.4.5.1.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta jovem face à toxicidade induzida por Zn .....	442
5.4.5.2. Planta adulta.....	444
5.4.5.2.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Zn .....	444
5.4.5.2.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos .....	446
5.4.5.2.3. Caracterização da resposta da planta adulta.....	449
5.4.5.2.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta adulta face à toxicidade induzida por Zn .....	455
5.4.6. Avaliação da toxicidade dos EPTs estudados .....	460
5.5. Conclusões .....	464
5.6. Referências Bibliográficas.....	470

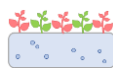


## Índice de Figuras

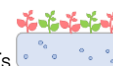
<b>Figura 5.1</b> – Locais de produção das ROS nas plantas. Fonte: adaptado de Sharma et al. (2012).....	303
<b>Figura 5.2</b> – Representação esquemática da formação das ROS nas plantas. Fonte: adaptado de Sharma et al. (2012).....	304
<b>Figura 5.3</b> – Danos oxidativos das ROS nas macromoléculas. Fonte: adaptado de Sharma et al. (2012).....	306
<b>Figura 5.4</b> - Representação esquemática da auto-oxidação dos fenóis. ....	311
<b>Figura 5.5</b> – Representação esquemática da via fenilpropanóide na síntese de flavonóides e antocianinas. Fonte: adaptado de Cooper-Driver (2001); Lee et al. (2005a) e (Winkel-Shirley, 2002).....	312
<b>Figura 5.6</b> – Representação esquemática da via ascorbato-glutationa (ou ciclo Halliwell-Asada). Fonte: adaptado de Foyer e Noctor (2009).....	316
<b>Figura 5.7</b> – Visão geral do sistema de defesa antioxidante nas plantas. Fonte: adaptado de Foyer e Noctor (2009) e Groß et al. (2013).....	318
<b>Figura 5.8</b> – Representação esquemática dos ensaios de avaliação da resposta antioxidante induzida pela acumulação de EPTs.....	327
<b>Figura 5.9</b> – Figuras ilustrativas dos ensaios de avaliação da resposta antioxidante com alface avermelhada que foi instalado, na sala de crescimento, no Horto de Química Agrícola. A-plantas de alface M4E contaminadas (4ª fase); B-plantas controlo de alface M4E (4ª fase); C-plantas com o tamanho desejado para a contaminação (3ª fase); D-desenvolvimento em hidroponia antes da contaminação (2ª fase).....	329
<b>Figura 5.10</b> – Registo fotográfico da planta jovem de alface M4E ao 2º dia de exposição com Cd. ....	333
<b>Figura 5.11</b> – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas jovens de alface M4E ao fim de 2 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 5 e 15 µM de Cd.....	334
<b>Figura 5.12</b> – Concentração de Cd em folha e raiz de plantas jovens de M4E ao fim de 2 dias de exposição a 5 e 15 µM de Cd. ....	335
<b>Figura 5.13</b> – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F2 e R2 ao fim de 2 dias de exposição a 5 (a) e 15 µM (b) de Cd. ....	336
<b>Figura 5.14</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante em F2 de alface M4E contaminada com 5 e 15 µM de Cd (indicado na figura como 5 e 15). ....	341
<b>Figura 5.15</b> – Registo fotográfico da planta adulta de alface M4E ao 20º dia de exposição com Cd. ....	343
<b>Figura 5.16</b> – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas adultas de alface M4E ao fim de 20 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 5 e 15 µM de Cd.....	343
<b>Figura 5.17</b> – Concentração de Cd em folha e raiz de plantas adultas de M4E ao fim de 20 dias de exposição a 5 e 15 µM de Cd.....	345
<b>Figura 5.18</b> – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F20, R20 e FV20 ao fim de 20 dias de exposição a 5 (a) e 15 µM (b) de Cd. ....	346
<b>Figura 5.19</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante em F20 de alface M4E contaminada com (a) 5 e (b) 15 µM de Cd (indicado na figura como 5 e 15). ....	355



<b>Figura 5.20</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante em R20 de alface M4E contaminada com 5 e 15 $\mu\text{M}$ de Cd (indicado na figura como 5 e 15).	356
<b>Figura 5.21</b> – Registo fotográfico da planta jovem de alface M4E ao 2º dia de exposição com Cr.	360
<b>Figura 5.22</b> – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas jovens de alface M4E ao fim de 2 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 5 e 15 $\mu\text{M}$ de Cr.	360
<b>Figura 5.23</b> – Concentração de Cr em folha e raiz de plantas jovens de M4E ao fim de 2 dias de exposição a 5 e 15 $\mu\text{M}$ de Cr.	362
<b>Figura 5.24</b> – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F2 e R2 ao fim de 20 dias de exposição a 5 (a) e 15 $\mu\text{M}$ (b) de Cr.	363
<b>Figura 5.25</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante em F2 de alface M4E contaminada com 5 e 15 $\mu\text{M}$ de Cr (indicado na figura como 5 e 15).	368
<b>Figura 5.26</b> – Registo fotográfico da planta adulta de alface M4E ao 20º dia de exposição com Cr.	369
<b>Figura 5.27</b> – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas adultas de alface M4E ao fim de 20 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 5 e 15 $\mu\text{M}$ de Cr.	370
<b>Figura 5.28</b> – Concentração de Cr em folha e raiz de plantas adultas de M4E ao fim de 20 dias de exposição a 5 e 15 $\mu\text{M}$ de Cr.	371
<b>Figura 5.29</b> – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F20, R20 e FV20 ao fim de 20 dias de exposição a 5 (a) e 15 $\mu\text{M}$ (b) de Cr.	373
<b>Figura 5.30</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante em F20 e R20 de alface M4E contaminada com 5 e 15 $\mu\text{M}$ de Cr (indicado na figura como 5 e 15).	382
<b>Figura 5.31</b> – Registo fotográfico da planta jovem de alface M4E ao 2º dia de exposição com Pb.	385
<b>Figura 5.32</b> – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas jovens de alface M4E ao fim de 2 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Pb.	386
<b>Figura 5.33</b> – Concentração de Pb em folha e raiz de plantas jovens de M4E ao fim de 2 dias de exposição a 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Pb.	387
<b>Figura 5.34</b> – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F2 e R2 ao fim de 2 dias de exposição a 125 (a) e 150 $\mu\text{M}$ (b) de Pb.	388
<b>Figura 5.35</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante em F2 de alface M4E contaminada com Pb. Nos esquemas estão representadas as vias ou compostos que são ativos para 125 (a) e 150 $\mu\text{M}$ (b) de Pb (indicado na figura como 125 e 150).	394
<b>Figura 5.36</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante em R2 de alface M4E contaminada com 125 e 150 $\mu\text{M}$ Pb (indicado na figura como 125 e 150).	395
<b>Figura 5.37</b> – Registo fotográfico da planta adulta de alface M4E ao 20º dia de exposição com Pb.	396
<b>Figura 5.38</b> – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas adultas de alface M4E ao fim de 20 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Pb.	397
<b>Figura 5.39</b> – Concentração de Pb em folhas e raiz de plantas adultas de M4E ao fim de 20 dias de exposição a 125 e 150 $\mu\text{M}$ de Pb.	398

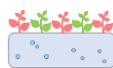


<b>Figura 5.40</b> – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F20, R20 e FV20 ao fim de 20 dias de exposição a 125 (a) e 150 $\mu$ M (b) de Pb. ....	400
<b>Figura 5.41</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante em F20 de alface M4E contaminada com Pb. Nos esquemas estão representadas as vias ou compostos que são ativos para 125 (a) e 150 $\mu$ M (b) de Pb (indicado na figura como 125 e 150).....	408
<b>Figura 5.42</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante em R20 de alface M4E contaminada com 125 e 150 $\mu$ M Pb (indicado na figura como 125 e 150).....	409
<b>Figura 5.43</b> – Registo fotográfico da planta adulta de alface M4E ao 2º dia de exposição com Ni. ....	413
<b>Figura 5.44</b> – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas jovens de alface M4E ao fim de 2 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50 e 125 $\mu$ M de Ni. ....	413
<b>Figura 5.45</b> – Concentração de Ni em folha e raiz de plantas jovens de M4E ao fim de 2 dias de exposição a 50 e 125 $\mu$ M de Ni. ....	414
<b>Figura 5.46</b> – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F2 e R2 ao fim de 2 dias de exposição a 50 (a) e 125 $\mu$ M (b) de Ni.....	415
<b>Figura 5.47</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante em F2 de alface M4E contaminada com 50 e 125 $\mu$ M Ni (indicado na figura como 50 e 125). ....	419
<b>Figura 5.48</b> – Registo fotográfico da planta adulta de alface M4E ao 20º dia de exposição com Ni. ....	420
<b>Figura 5.49</b> – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas adultas de alface M4E ao fim de 20 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50 e 125 $\mu$ M de Ni. ....	420
<b>Figura 5.50</b> – Concentração de Ni em folhas e raiz de plantas adultas de M4E ao fim de 20 dias de exposição a 50 e 125 $\mu$ M de Ni.....	422
<b>Figura 5.51</b> – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F20, R20 e FV20 ao fim de 20 dias de exposição a 50 (a) e 125 $\mu$ M (b) de Ni. ....	423
<b>Figura 5.52</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante em R20 de alface M4E contaminada com 50 e 125 $\mu$ M Ni (indicado na figura como 50 e 125). ....	430
<b>Figura 5.53</b> - Representação esquemática da resposta antioxidante em F20 de alface M4E contaminada com Ni. Nos esquemas estão representadas as vias ou compostos que são ativos para 50 (a) e 125 $\mu$ M (b) de Ni (indicado na figura como 50 e 125).....	431
<b>Figura 5.54</b> – Registo fotográfico da planta jovem de alface M4E ao 2º dia de exposição com Zn.....	435
<b>Figura 5.55</b> – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas jovens de alface M4E ao fim de 2 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50 e 150 $\mu$ M de Zn. ....	435
<b>Figura 5.56</b> – Concentração de Zn em folha e raiz de plantas jovens de M4E ao fim de 2 dias de exposição a 50 e 150 $\mu$ M de Zn .....	436
<b>Figura 5.57</b> – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F2 e R2 ao fim de 2 dias de exposição a 50 (a) e 150 $\mu$ M (b) de Zn.....	438
<b>Figura 5.58</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante em F2 de alface M4E contaminada com 50 e 150 $\mu$ M Zn (indicado na figura como 50 e 150).....	443



- Figura 5.59** – Representação esquemática da resposta antioxidante em R2 de alface M4E contaminada com 50 e 150  $\mu\text{M}$  Zn (indicado na figura como 50 e 150).....444
- Figura 5.60** – Registo fotográfico da planta adulta de alface M4E ao 20º dia de exposição com Zn.....445
- Figura 5.61** – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas adultas de alface M4E ao fim de 20 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50 e 150  $\mu\text{M}$  de Zn. ....445
- Figura 5.62** – Concentração de Zn em folhas e raiz de plantas adultas de M4E ao fim de 20 dias de exposição a 50 e 150  $\mu\text{M}$  de Zn. ....447
- Figura 5.63** – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F20, R20 e FV20 ao fim de 20 dias de exposição a 50 (a) e 150  $\mu\text{M}$  (b) de Zn.....448
- Figura 5.64** – Representação esquemática da resposta antioxidante em F20 de alface M4E contaminada com 50 e 150  $\mu\text{M}$  Zn (indicado na figura como 50 e 150).....456
- Figura 5.65** – Representação esquemática da resposta antioxidante em R20 de alface M4E contaminada com 50 e 150  $\mu\text{M}$  Zn (indicado na figura como 50 e 150).....457
- Figura 5.66** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos, de plantas jovens de alface M4E, expostos a Cd (15  $\mu\text{M}$ ), Cr (15  $\mu\text{M}$ ), Pb (150  $\mu\text{M}$ ), Ni (125  $\mu\text{M}$ ) e Zn (150  $\mu\text{M}$ ), ao fim de 2 dias de tratamento ( $n=3$ ). A análise classificatória é efetuada com os resultados obtidos, em folhas, para os teores de  $H_2O_2$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e MDA ( $\mu\text{M g}^{-1}$ ), teor de compostos fenólicos ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e antocianinas ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ), atividades enzimáticas da SOD, CAT, POD, APX, GPX, GR e PAL ( $\text{U g}^{-1}$ ), metabolitos antioxidantes não-enzimáticos (ASA, GSH,  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ). Estas duas componentes explicam 78,38 % da variabilidade.....461
- Figura 5.67** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos, de plantas jovens de alface M4E, expostos a Cd (15  $\mu\text{M}$ ), Cr (15  $\mu\text{M}$ ), Pb (150  $\mu\text{M}$ ), Ni (125  $\mu\text{M}$ ) e Zn (150  $\mu\text{M}$ ), ao fim de 2 dias de tratamento ( $n=3$ ). A análise classificatória é efetuada com os resultados obtidos, em raiz, os teores de  $H_2O_2$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e MDA ( $\mu\text{M g}^{-1}$ ), atividades enzimáticas da SOD, CAT, POD e GR ( $\text{U g}^{-1}$ ). Estas duas componentes explicam 73,40 % da variabilidade. ....461
- Figura 5.68** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos, de plantas adultas de alface M4E, expostos a Cd (15  $\mu\text{M}$ ), Cr (15  $\mu\text{M}$ ), Pb (150  $\mu\text{M}$ ), Ni (125  $\mu\text{M}$ ) e Zn (150  $\mu\text{M}$ ), ao fim de 20 dias de tratamento ( $n=3$ ). A análise classificatória é efetuada com os resultados obtidos, em folhas novas, para os teores de  $H_2O_2$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e MDA ( $\mu\text{M g}^{-1}$ ), teor de compostos fenólicos ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e antocianinas ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ), atividades enzimáticas da SOD, CAT, POD, APX, GPX, GR e PAL ( $\text{U g}^{-1}$ ), metabolitos antioxidantes não-enzimáticos (ASA, GSH,  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ). Estas duas componentes explicam 73,93 % da variabilidade.....462
- Figura 5.69** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos, de plantas adultas de alface M4E, expostos a Cd (15  $\mu\text{M}$ ), Cr (15  $\mu\text{M}$ ), Pb (150  $\mu\text{M}$ ), Ni (125  $\mu\text{M}$ ) e Zn (150  $\mu\text{M}$ ), ao fim de 20 dias de tratamento ( $n=3$ ). A análise classificatória é efetuada com os resultados obtidos, em raiz, os teores de  $H_2O_2$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e MDA ( $\mu\text{M g}^{-1}$ ), atividades enzimáticas da SOD, CAT, POD, APX, GR ( $\text{U g}^{-1}$ ) e ASA ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ). Estas duas componentes explicam 73,15 % da variabilidade. ....462

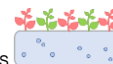




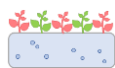
## Índice de Tabelas

<b>Tabela 5.1</b> – Concentrações de EPT aplicadas, para cada modalidade, nos ensaios de avaliação da resposta antioxidante induzida pela acumulação de EPTs com cultura sem solo.	326
<b>Tabela 5.2</b> – Cronograma utilizado para a realização dos ensaios de avaliação da resposta antioxidante induzida pela acumulação de EPTs.	328
<b>Tabela 5.3</b> – Determinações analíticas efetuadas, com material vegetal seco e fresco, para a planta jovem.	330
<b>Tabela 5.4</b> – Determinações analíticas efetuadas, com material vegetal seco e fresco, para a planta adulta.	331
<b>Tabela 5.5</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Cd.	338
<b>Tabela 5.6</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Cd.	340
<b>Tabela 5.7</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Cd.	348
<b>Tabela 5.8</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Cd.	349
<b>Tabela 5.9</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na FV20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Cd.	349
<b>Tabela 5.10</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Cr.	365
<b>Tabela 5.11</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Cr.	367
<b>Tabela 5.12</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Cr.	375
<b>Tabela 5.13</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Cr.	376
<b>Tabela 5.14</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na FV20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Cr.	376
<b>Tabela 5.15</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Pb.	391
<b>Tabela 5.16</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Pb.	393
<b>Tabela 5.17</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Pb.	402
<b>Tabela 5.18</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Pb.	403
<b>Tabela 5.19</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na FV20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Pb.	403
<b>Tabela 5.20</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Ni.	417
<b>Tabela 5.21</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Ni.	418
<b>Tabela 5.22</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Ni.	425





<b>Tabela 5.23</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Ni. ....	426
<b>Tabela 5.24</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na FV20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Ni. ....	426
<b>Tabela 5.25</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Zn. ....	439
<b>Tabela 5.26</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Zn. ....	441
<b>Tabela 5.27</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Zn. ....	450
<b>Tabela 5.28</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Zn. ....	451
<b>Tabela 5.29</b> – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na FV20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Zn. ....	451
<b>Tabela 5.30</b> – Resumo da resposta obtida em folhas novas expostas a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn, para as plantas jovens e adultas. ....	465
<b>Tabela 5.31</b> – Resumo da resposta obtida na raiz exposta a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn, para as plantas jovens e adultas. ....	466
<b>Tabela 5.32</b> – Resumo da resposta obtida nas folhas velhas expostas a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn, para as plantas adultas. ....	466



## Resumo

Neste Capítulo é feita uma caracterização dos mecanismos de resposta metabólica específica da planta que permitem suportar as elevadas concentrações de Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn, nos seus diferentes órgãos. Os ensaios realizam-se com cultura sem solo e são analisados diferentes parâmetros subjacentes à capacidade de tolerância, nomeadamente, mecanismos antioxidantes intracelulares enzimáticos (SOD, CAT, POD, GR, APX, GPX) e não-enzimáticos (ASA, GSH), indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas ( $H_2O_2$ , MDA) e indicadores de avaliação da intensidade do stresse (clorofilas, antocianinas, PAL, compostos fenólicos).

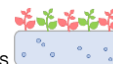
São definidos 2 níveis de toxicidade diferentes, que permitem o desenvolvimento vegetativo, mas que induzam respostas metabólicas características, para um nível de menor e maior toxicidade. Estes ensaios permitem estudar o efeito destas concentrações, durante um tempo de exposição curto (2 dias após contaminação) e longo (20 dias após contaminação), para se perceber quais as estratégias de resposta da planta.

Na planta de alface, os resultados obtidos indicam que a capacidade de resposta da planta difere consoante a intensidade do stresse e cada EPT desencadeia a ativação de diferentes mecanismos de destoxificação na planta.

Na planta jovem observa-se um menor grau de stresse oxidativo, porque a planta demonstra tolerar a presença destes EPTs, não apresentando sintomas visíveis de toxicidade. Este comportamento é comprovado através do não aparecimento de danos oxidativos (peroxidação lipídica) e controlo dos níveis de  $H_2O_2$ , nas plantas expostas a Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn.

Na planta adulta, os elementos que apresentam maiores valores percentuais de translocação para a parte aérea (Cd, Ni, Zn) são os que têm maior efeito em folhas. As folhas demonstram ser mais sensíveis à presença de EPTs quando comparado com a raiz, apesar de ser na raiz que se verifica uma maior acumulação de cada elemento. Diferentes fatores contribuem para este comportamento, nomeadamente (i) um maior teor de ROS nas folhas, (ii) uma menor toxicidade provocada por alguns EPTs retidos na raiz, relativamente à parte aérea, e (iii) provavelmente, uma incapacidade na defesa da planta em remover os ROS que originam danos oxidativos na parte aérea comparativamente às raízes.

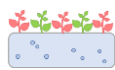
Em folhas novas, são identificados os mecanismos de resposta metabólica específicos da planta ativados face à presença de Cd (PAL, compostos fenólicos, antocianinas, CAT, APX,



POD, GSH), Ni (PAL, antocianinas, CAT, POD, ASA, GSH) e Zn, (PAL, compostos fenólicos, antocianinas, SOD, POD, APX, GPX, ASA, GSH). No caso da contaminação com Cr (compostos fenólicos, antocianinas, ASA, GR) e Pb (CAT, GPX, ASA, GSH), possivelmente por estes elementos serem muito pouco translocados para a parte aérea, a resposta da planta é eficiente e não existem danos oxidativos. As folhas velhas evidenciam um grau de intensidade de stresse superior para a maior parte dos metais estudados.

Na raiz, a exposição a 125  $\mu\text{M}$  de Pb, 125  $\mu\text{M}$  de Ni, 150  $\mu\text{M}$  de Zn, origina o aparecimento de danos oxidativos neste órgão, e a planta não consegue controlar o stresse oxidativo, sendo isso também evidente pelo aparecimento de sintomas visíveis neste órgão. Nos restantes elementos, os níveis de stresse oxidativo são eficientemente controlados, principalmente, através da CAT, POD e síntese de ASA. Para além disso, parte dos EPTs ficam retidos nas raízes, provavelmente adsorvidos às paredes celulares ou ligados a ácidos orgânicos ou quelatos, sendo posteriormente armazenados nos vacúolos.

A resposta da planta resulta da conjugação de diferentes fatores como o seu estado de desenvolvimento, os diferentes órgãos da planta (raiz ou parte aérea), o tipo de EPT, a influência de cada EPT nos elementos químicos absorvidos, a quantidade de EPT acumulada, o tempo de exposição ao stresse e a intensidade do tratamento aplicado. Através destes fatores é possível compreender que a planta de alface M4E apresenta uma resposta condicionada pelas condições de stresse a que é sujeita.



## Capítulo V - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE INDUZIDA PELA ACUMULAÇÃO DE EPTs

### 5.1. Objetivo

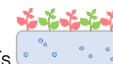
Com este Capítulo pretende-se clarificar quais os mecanismos de resposta metabólica específicos da planta que permitem suportar as elevadas concentrações de Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn, nos seus diferentes órgãos. Pretende-se identificar mecanismos antioxidantes intracelulares subjacentes à capacidade de tolerância (enzimáticos e não-enzimáticos) e avaliar os indicadores de fitotoxicidade mais adequados para cada EPT.

No Capítulo anterior, a alface M4E demonstrou ser menos tolerante à presença destes EPTs e acumulou uma quantidade superior destes elementos, relativamente à outra cultivar em estudo. Este comportamento reflete que existem alterações bioquímicas resultantes de uma resposta metabólica específica desta cultivar face ao stresse, que pode estar relacionado com a presença de antocianinas. Por este motivo, os ensaios para avaliação da resposta antioxidante foram realizados com alface M4E exposta a condições de stresse induzido por elementos não-essenciais (cádmio, crómio e chumbo) e essenciais (níquel e zinco), em solução nutritiva.

Com base nos resultados obtidos no **Capítulo IV**, foram definidas duas concentrações, correspondentes a 2 níveis de toxicidade diferentes, que permitissem o desenvolvimento vegetativo, mas que simultaneamente induzissem respostas metabólicas características, para um nível de menor e maior toxicidade. Com estes ensaios pretende-se estudar o efeito destes dois níveis de concentrações, durante um tempo de exposição curto (2 dias após contaminação) e longo (20 dias após contaminação), para se perceber quais as estratégias de resposta da planta face a estas condições de stresse.

### 5.2. Introdução

Os organismos aeróbios precisam de oxigénio ( $O_2$ ) como aceitador final de eletrões para produzir energia. No entanto, o oxigénio é um forte oxidante sendo, por vezes, impossível impedir a ocorrência de oxidações secundárias, que não estão envolvidas no metabolismo fisiológico normal, e que podem ter consequências prejudiciais, caso estes produtos resultantes não sejam neutralizados por um sistema antioxidante eficiente.



Nas plantas, o stresse provocado por condições ambientais, tais como a exposição ao frio, seca, salinidade, toxicidade provocada por metais pesados, radiação UV-B, presença de organismos patogénicos, etc, origina um aumento na produção das espécies reativas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species*, ROS) devido ao desequilíbrio da homeostase celular (Andresen et al., 2016; Borsani et al., 2001; Cannata et al., 2014; Maheshwari e Dubey, 2009; Malacrida et al., 2006; Sánchez-González et al., 2016; Torres, 2010).

O controlo dos níveis de ROS das células é composto por mecanismos de defesa enzimáticos e não-enzimáticos (Noctor e Foyer, 1998) e consiste na destoxificação das ROS com o objetivo de contrariar o seu efeito prejudicial.

Alguns destes mecanismos fazem parte da resposta intrínseca e imediata, outros são ativados, apenas, quando um sinal específico de stresse é recebido. Os *scavengers*<sup>1</sup> enzimáticos das ROS incluem as enzimas antioxidantes, como a superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol-peroxidase (POD), glutathione-peroxidase (GPX) e enzimas da via ascorbato-glutathione (via ASA-GSH), como a ascorbato-peroxidase (APX), monodesidroascorbato-redutase (MDHAR), desidroascorbato-redutase (DHAR) e a glutathione-redutase (GR). Os não-enzimáticos são compostos com atividade antioxidante presentes nas células, como o ASA, GSH,  $\alpha$ -tocoferol, compostos fenólicos, carotenóides e ácidos orgânicos, entre outros.

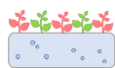
A adaptação e sobrevivência da planta quando é sujeita a um stresse, provocado pela presença de EPTs, como os metais pesados, depende principalmente da sua capacidade em resistir aos danos oxidativos e da atividade do seu sistema de defesa antioxidante, assim como aos danos causados diretamente pelos metais pesados na planta. A manutenção de uma elevada capacidade antioxidante, com um aumento na atividade de várias enzimas para destoxificar as ROS, está relacionada com a tolerância da planta sujeita a estes stresses ambientais (Chen et al., 2010; Mourato et al., 2015; Zaefyzadeh et al., 2009).

### 5.2.1. O stresse oxidativo

O stresse é um fator externo que influencia de forma indesejável os organismos vivos. O metabolismo aeróbio tem como consequência inevitável a produção de ROS (Apel e Hirt,

---

<sup>1</sup> *scavengers of ROS* - é uma expressão muito utilizada na bibliografia de língua inglesa, mas com difícil tradução para português. Traduz-se em moléculas que tem a capacidade de destoxificar as ROS e na sua consequente eliminação das células.



2004; Navrot et al., 2007) que se formam, regular e continuamente, nas células (Scandalios, 2005; Sytar et al., 2013), havendo simultaneamente a produção de antioxidantes de forma a manter um equilíbrio redox (Halliwell, 2006; Sharma e Dietz, 2009).

Em condições fisiológicas normais, a maior parte das ROS são produzidas em quantidades baixas, sendo a sua formação e eliminação rigorosamente controladas. Um stresse mais severo, pode desencadear uma série de reações que levam, no limite, à morte celular (Moller et al., 2007; Nagajyoti et al., 2010; Rascio e Navari-Izzo, 2011).

O stresse oxidativo é definido como um desequilíbrio derivado de um aumento do nível intracelular das ROS ou de uma diminuição da capacidade antioxidante, que pode ser de origem biótica ou abiótica. O *oxidative burst*<sup>2</sup> conduz a uma acumulação rápida destas espécies, uma vez que a velocidade de produção é mais rápida que a de remoção. Este desequilíbrio desencadeia, no interior das células, uma resposta metabólica que se traduz na ativação de mecanismos específicos de destoxificação das ROS, de forma a controlar a sua acumulação e evitar os seus efeitos adversos a nível celular.

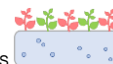
As ROS incluem radicais livres como o ião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), bem como moléculas não radicais como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o singleto de oxigénio ( $^1O_2$ ). Estas espécies apresentam um elevado poder oxidante, afetando diversos processos metabólicos que ocorrem nas células. As ROS são muito instáveis podendo: (i) provocar danos nos componentes celulares, inibição enzimática e ativação das vias de morte celular programada (Armas et al., 2015; Kissoudis et al., 2016; Martins et al., 2011; Meriga et al., 2004; Srivastava e Dubey, 2011; Sytar et al., 2013; Verma e Dubey, 2003) ou (ii) atuarem como importantes mensageiros secundários induzindo a ativação do sistema de defesa da planta, o que confere uma certa tolerância ao stresse (Foyer e Noctor, 2005; Miller et al., 2010; Mittler et al., 2011). Devido ao papel multifuncional das ROS é necessário que as células controlem rigorosamente os seus níveis para evitar danos oxidativos, sem as eliminar completamente.

### 5.2.2. As espécies reativas de oxigénio

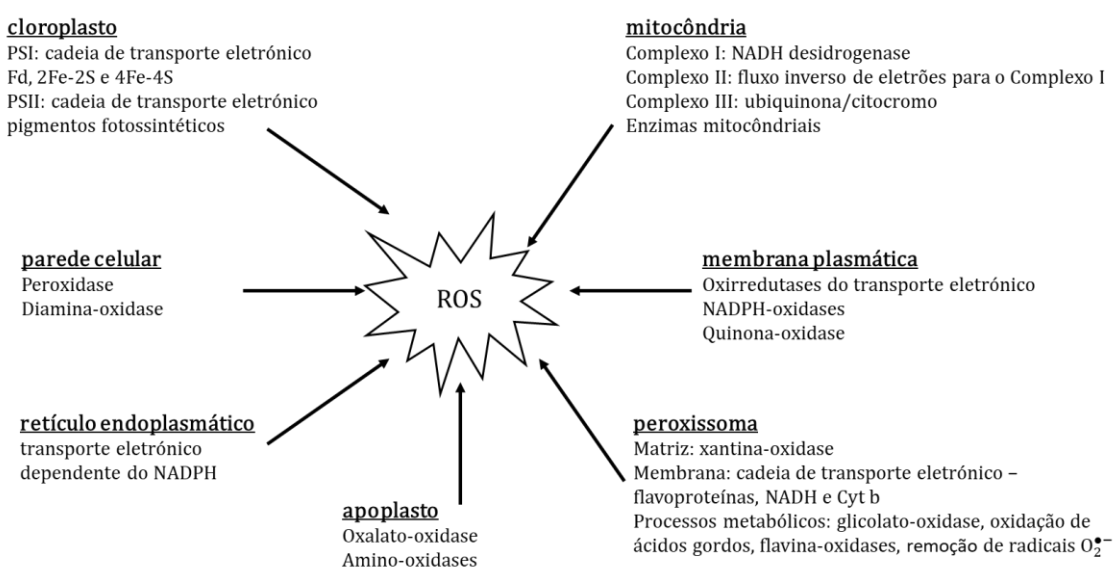
Na mitocôndria, a fosforilação oxidativa e síntese do ATP é uma consequência do transporte de eletrões através da cadeia transportadora de eletrões (CTE). Neste processo, os eletrões são transportados por complexos proteicos com potencial redutor sucessivamente menor,

---

<sup>2</sup> *oxidative burst* - traduz-se numa “oxidação explosiva”, ou seja, num rápido conjunto de reações de oxidação originando a formação de ROS.

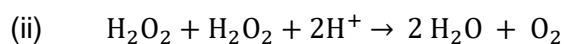
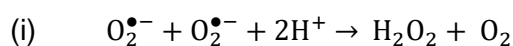


através de reações de oxidação-redução. O aceitador final de elétrons é o  $O_2$  que é reduzido para produzir água ( $H_2O$ ). Contudo, algum oxigênio pode ser reduzido de forma incompleta, originando vários intermediários com elevado poder oxidante, que podem conduzir a oxidações secundárias. Estima-se que cerca de 1 % de  $O_2$  consumido pelas plantas é utilizado de forma indevida para produzir ROS (Asada e Takahashi, 1987), em diversos compartimentos celulares, tais como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas. Na **Figura 5.1** estão indicados os principais locais de produção das ROS nas plantas.



**Figura 5.1** – Locais de produção das ROS nas plantas. Fonte: adaptado de Sharma et al. (2012).

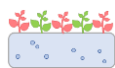
Esta redução incompleta ocorre principalmente nos complexos I e III da CTE, na mitocôndria, dando origem ao radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). A eliminação natural deste radical pode ser realizada pelas seguintes reações de (i) dismutação e, conseqüente (ii) redução do peróxido de hidrogénio formado:



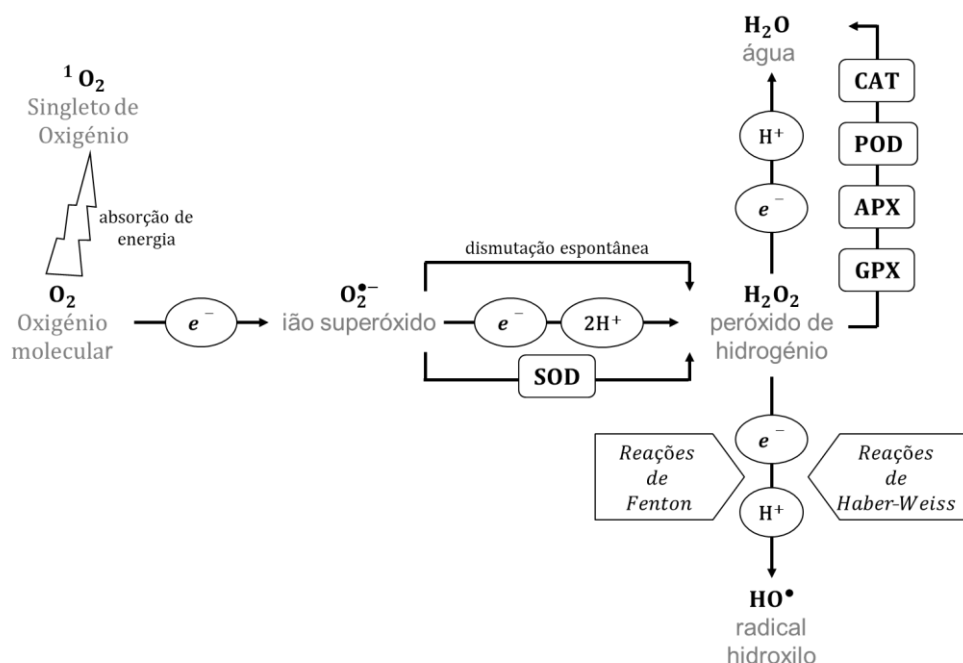
Nos cloroplastos, ocorre a produção do singlete de oxigénio ( $^1O_2$ ) no fotossistema II e do  $O_2^{\bullet-}$  no fotossistema I e II (Edreva, 2005). Os peroxissomas produzem  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  em diversas reações metabólicas.

O stresse desencadeia a redução de moléculas de  $O_2$  no estado fundamental, com a conseqüente produção de moléculas intermediárias, que são muito mais tóxicas e reativas





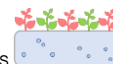
que o oxigênio. O  $O_2$  é uma molécula com menor reatividade que as ROS porque apresenta dois elétrons desemparelhados com spin paralelo sendo menos provável que participe em reações com moléculas orgânicas. No entanto, a sua ativação pode ocorrer de duas formas: (i) absorção de energia suficiente para provocar uma inversão de spin de um elétron não emparelhado ( $^1O_2$ ) e (ii) redução gradual por transferência de 1, 2 ou 3 elétrons ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e  $HO^{\bullet}$ ) (Apel e Hirt, 2004; Foyer e Noctor, 2009) (**Figura 5.2**).



**Figura 5.2** – Representação esquemática da formação das ROS nas plantas. Fonte: adaptado de Sharma et al. (2012).

Devido à restrição de spin, o  $O_2$  molecular não pode aceitar 4 elétrons de uma vez para formar  $H_2O$ , logo durante a sua redução formam-se subprodutos inevitáveis de forma gradual (Saed-Moucheshi et al., 2013). O  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  são espécies que se formam em condições metabólicas normais e, nestas condições, a quantidade formada é controlada por mecanismos existentes nos organismos que estão preparados para as eliminar, evitando os danos oxidativos que estas causariam nos componentes celulares.

O  $O_2^{\bullet-}$  é moderadamente reativo, tem curta duração e um tempo de meia-vida de 1  $\mu s$  (Halliwell, 1977). O  $O_2^{\bullet-}$  é a primeira forma de ROS a ser formada na célula e que inicia a sequência de reações que produzem outras ROS. Estas são produzidas predominantemente através de processos catalisados por enzimas ou metais (Valko et al., 2005) dependendo do tipo de célula ou compartimento celular. Esta espécie sofre facilmente dismutação em  $H_2O_2$  quer de forma espontânea e não-enzimática ou através da atividade da SOD.



O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é uma espécie moderadamente reativa, com elevada estabilidade e apresenta um tempo de meia vida relativamente longo de 1 ms (Mittler e Zilinskas, 1991). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é convertido em  $\text{H}_2\text{O}$  pela CAT, POD, APX ou GPX. As maiores fontes de produção de peróxido nas células de plantas são o transporte eletrônico nos cloroplastos e mitocôndrias, bem como o retículo endoplasmático, membrana plasmática,  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos e a fotorrespiração. O peróxido também é produzido em tecidos que o utilizam como substrato na lignificação e suberização (Huang et al., 2016b; Rui et al., 2016). Ao contrário de outras ROS, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  não tem nenhum elétron desemparelhado, podendo facilmente atravessar membranas biológicas e, conseqüentemente, causar danos oxidativos longe do local da sua formação (Bienert et al., 2007).

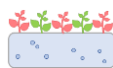
O  $\text{H}_2\text{O}_2$  dá uma indicação sobre os teores de ROS presentes pelo que é usado como parâmetro indicador de stresse oxidativo e da tolerância ao stresse, mas tem também um importante papel de molécula sinalizadora envolvida na regulação de processos biológicos específicos e que tem que ser considerado (Neill et al., 2002). A sua acumulação pode desencadear a produção de outras ROS e a sua toxicidade é potenciada pela presença de metais que catalisam as reações de Fenton e de Haber-Weiss. Em elevadas concentrações, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode oxidar a cisteína (-SH) ou resíduos de metionina (-SCH<sub>3</sub>), e inativar enzimas através da oxidação dos seus grupos tiol, como as enzimas do ciclo de Calvin, Cu/Zn-SOD e Fe-SOD.

O  $\text{HO}^\bullet$  e  $^1\text{O}_2$  são consideradas espécies muito mais reativas e perigosas, formando-se apenas em condições de stresse. O tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  dentro da célula é de provavelmente 3  $\mu\text{s}$  ou menos (Hatz et al., 2007).

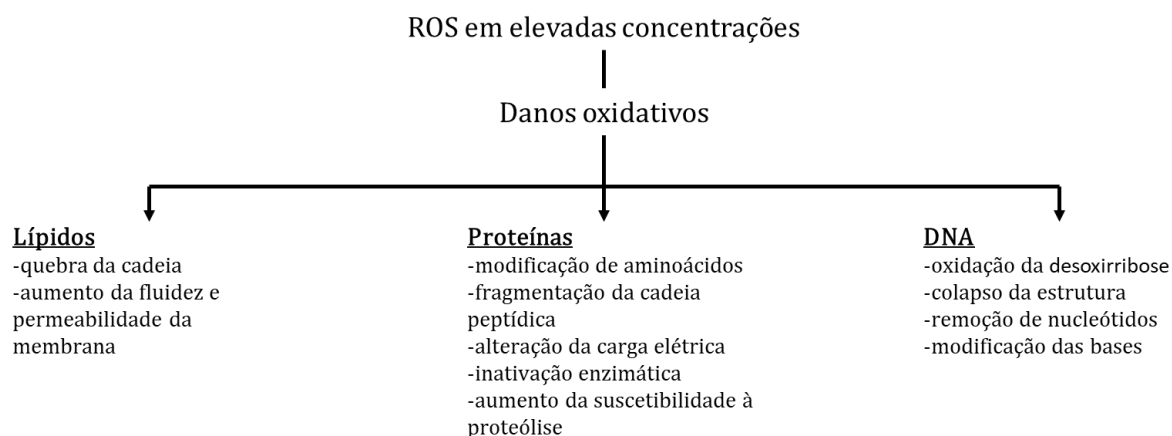
O  $\text{HO}^\bullet$  é a espécie mais reativa de todas as ROS, tendo um tempo de vida curto e os seus locais de reação são perto dos locais de formação (Elstner, 1982). Tem um único elétron não emparelhado, podendo reagir com o  $^3\text{O}_2$ . É um caso particular pois não se conhecem mecanismos específicos que consigam eliminar o seu efeito e ocorre apenas quando não se conseguem eliminar as formas que lhe dão origem. As reações sequenciais para a formação deste radical têm que ser evitadas de modo a prevenir os danos oxidativos, sendo mais útil para a célula controlar os seus precursores, como o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Moller et al., 2007).

### 5.2.3. Danos oxidativos causados pelas ROS

Os agentes que causam stresse oxidativo levam à formação das ROS e estas promovem reações oxidativas que vão atuar e danificar alguns constituintes essenciais da célula,



podendo provocar a peroxidação dos lípidos, oxidação das proteínas e danos nos ácidos nucleicos (**Figura 5.3**).



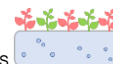
**Figura 5.3** – Danos oxidativos das ROS nas macromoléculas. Fonte: adaptado de Sharma et al. (2012).

Isto vai ter implicações negativas nas células, como a perda das funções de certos organelos, causar danos nas membranas, inibir enzimas, reduzir a eficiência metabólica e a fixação de carbono e causar mutações. Estas reações, no limite, poderão originar a morte celular (Moller et al., 2007; Scandalios, 2005).

Os diferentes tipos de ROS têm alvos preferenciais nas células, como é o caso das membranas celulares. Um aumento na peroxidação lipídica está diretamente associado a um aumento na produção das ROS e, por essa razão, o nível de peroxidação tem sido amplamente utilizado como indicador dos danos oxidativos que ocorrem em condições de stresse. Vários estudos referem que nas plantas que cresceram em condições de stresse houve um aumento da peroxidação dos lípidos (Chaffai et al., 2007; Gajewska et al., 2012; Pinto et al., 2017; Pompeu et al., 2016; Singh et al., 2015).

A avaliação dos danos nas membranas lipídicas causados pelo stresse oxidativo é feita através dos produtos resultantes da peroxidação dos lípidos, como é o caso do malondialdeído (MDA) que é frequentemente usado como biomarcador do stresse oxidativo, tanto em folhas como em raízes (Dixit et al., 2001; Sandalio et al., 2001). Neste processo os radicais livres, principalmente o  $\text{HO}^\bullet$ , vão captar electrões dos ácidos gordos polinsaturados (AGPI) das membranas lipídicas causando a sua oxidação e, conseqüentemente, peroxidação lipídica.

Os locais comuns de ataque das ROS em lípidos membranares são as insaturações e a ligação éster entre o glicerol e os ácidos gordos. A peroxidação lipídica agrava o stresse



oxidativo uma vez que também ela produz radicais, derivados dos produtos finais da peroxidação dos lípidos, que podem também reagir e danificar proteínas e ácidos nucleicos (Sytar et al., 2013).

A fotossíntese é um dos principais processos biológicos afetados quando uma planta está sob condições de stresse (Foyer e Noctor, 2009). Os metais pesados influenciam o normal funcionamento do sistema fotossintético, resultando na sua inibição, originando danos foto-oxidativos e nos componentes da cadeia transportadora de eletrões fotossintética, prejudicando as reações tanto da fase luminosa como da escura da fotossíntese (Andresen et al., 2016; Bernardini et al., 2016). Por consequência, a absorção de metais pesados e a sua acumulação nas diferentes partes da planta interfere em diversos processos, e podendo aumentar ou diminuir a biossíntese de pigmentos, como as clorofilas, carotenóides e antocianinas.

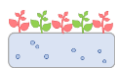
A diminuição da concentração de clorofila, devido à inibição do processo fotossintético, pode estar relacionada com a degradação de clorofilas ou a inibição da sua produção (Choppala et al., 2014). Esta degradação ocorre pela substituição do Mg na molécula de clorofila e do Fe nas ferredoxinas envolvidas na transferência de eletrões, na fase luminosa da fotossíntese. A carência de Mg e Fe (que pode ser induzida por concentrações elevadas de outros EPTs), leva ao aparecimento de cloroses (Domańska et al., 2015; Kashem e Kawai, 2007).

A concentração de pigmentos, como as clorofilas (clorofila total, a, b), pode ser também um parâmetro de avaliação da intensidade do stresse, uma vez que as alterações dos seus teores intracelulares podem ser uma consequência da exposição aos metais pesados.

#### **5.2.4. Respostas metabólicas da planta ao stresse oxidativo**

De forma a evitar os danos oxidativos resultantes, as plantas aumentam o nível de defesa antioxidante endógena (Nagajyoti et al., 2010; Viehweger, 2014). As plantas quando sujeitas a condições de stresse utilizam mecanismos de tolerância e de destoxificação, para combater este efeito prejudicial:

- (i) a primeira etapa para lidar com a presença de um EPT consiste numa estratégia para evitar que ocorra o início do stresse, ou seja, impedir a sua entrada a partir da raiz (Viehweger, 2014). As plantas restringem a entrada ou absorção do metal através da associação destes elementos com micorrizas, sequestro de metais, ou



complexação de metais com compostos orgânicos que são exsudados pela raiz (Clemens et al., 2002; Dalvi e Bhalariao, 2013).

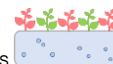
- (ii) a segunda etapa, caso a primeira estratégia falhe e os metais pesados consigam entrar nas células das plantas, consiste na ativação de mecanismos de defesa que incluem a sequestração dos metais em vários compartimentos intracelulares como os vacúolos, ligação de metais às paredes celulares, biossíntese e acumulação de osmólitos (como a prolina), complexação intracelular ou quelatação de íons metálicos através da libertação de várias substâncias, como ácidos orgânicos, polissacáridos, fitoquelatinas e metalotioneínas (Huang et al., 2016a; Liu et al., 2016; Song et al., 2014).
- (iii) caso estas medidas sejam inúteis e as plantas continuem sobrecarregadas com o efeito tóxico do metal, ocorre a ativação de mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos e não-enzimáticos.

As vias de destoxificação das ROS presentes nos diferentes compartimentos celulares estão coordenadas. Quando uma célula é sujeita a um stresse oxidativo, a defesa baseia-se na utilização de sistemas de *scavenging*, como os antioxidantes não-enzimáticos (glutathione, ascorbato) e os antioxidantes enzimáticos primários (SOD, CAT, POD) e na ativação de antioxidantes enzimáticos específicos, como é o caso da via ASA-GSH.

#### 5.2.4.1. Mecanismos de defesa não-enzimáticos

As células apresentam mecanismos de defesa não-enzimáticos, que são compostos antioxidantes capazes de se oxidar, preferencialmente, em vez de outras biomoléculas, protegendo-as do efeito nocivo das ROS. Desta forma, são capazes de diminuir o seu impacto e conseguem degradá-las impedindo que haja formação de novas espécies reativas.

Os metabolitos não-enzimáticos da defesa antioxidante incluem substâncias como o ascorbato (ASA) e a glutathione (GSH), bem como o  $\alpha$ -tocoferol, carotenóides e compostos fenólicos (Oh et al., 2009b; Ramakrishna e Ravishankar, 2011). Estes atuam como compostos redutores e reguladores redox. Para além de serem utilizados como co-fatores enzimáticos, são compostos antioxidantes que influenciam o crescimento e desenvolvimento das plantas (De Pinto e De Gara, 2004). Alguns estudos referem que mutantes com diminuição nos teores de compostos antioxidantes não-enzimáticos demonstraram serem hipersensíveis ao stresse (Eltayeb et al., 2010; Gao e Zhang, 2008; Semchuk et al., 2009).



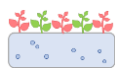
O ASA e a GSH são compostos intermediários da via ASA-GSH, que irá ser descrita posteriormente, e desempenham um papel importante, no citosol e nos cloroplastos, na destoxificação do  $H_2O_2$ . Este ciclo não só mantém num nível adequado as suas formas reduzidas, ajustando o potencial redox das células, como também participa na destoxificação das ROS. O ASA e a GSH podem também exercer o seu poder antioxidante isoladamente, sendo oxidados diretamente pelas ROS, contudo esta reação apresenta uma cinética mais lenta (Noctor e Foyer, 1998; Potters et al., 2002).

O ascorbato é o antioxidante de baixo peso molecular mais abundante e pode ser encontrado na maior parte das células das plantas (Shao et al., 2008), sendo particularmente abundante nos tecidos fotossintéticos (Smirnoff et al., 2004). Cerca de 90 % do ASA localiza-se no citoplasma, mas ao contrário de outros antioxidantes, uma porção substancial é exportada para o apoplasto, onde está presente na ordem dos mM. O ASA presente no apoplasto é considerado a primeira linha de defesa contra os oxidantes externos potencialmente prejudiciais (Barnes et al., 2002).

Nas plantas, encontra-se em elevadas concentrações nos cloroplastos onde a redução do  $O_2^{\bullet-}$  pelo ascorbato é bastante rápida. O ASA tem um papel fundamental na defesa contra o stresse oxidativo, sendo um agente redutor muito importante na remoção do  $H_2O_2$  (enzimaticamente, através da APX) e reagindo diretamente com o  $^1O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$  e  $HO^{\bullet}$ , e assim neutralizando o seu efeito (Potters et al., 2002).

O ASA protege as macromoléculas dos danos oxidativos, previne a oxidação de enzimas que contêm grupos metálicos, participa na regulação da fotossíntese e nos mecanismos de proteção de membranas, e interfere na regeneração de outros antioxidantes, como o  $\alpha$ -tocoferol (Bielen et al., 2013). O ASA tem sido referido em bibliografia como agente redutor na resposta da planta a vários stresses (Armas et al., 2015; Carvalho et al., 2016; Hernández et al., 2001; Jozefczak et al., 2015; Radyuk et al., 2009; Zhang et al., 2016).

A glutathione tem sido detetada em todos os compartimentos celulares, como o citosol, cloroplastos, reticulo endoplasmático, vacúolos e mitocôndria (Foyer e Noctor, 2003). É um tripéptido de ácido glutâmico, cisteína e glicina ( $\gamma$ -glu-cys-gly), e na forma reduzida (GSH) tem um grupo tiol (-SH) livre no resíduo de cisteína. Assim, em processos de oxidação-redução, a GSH atua como agente redutor, sofrendo oxidação e é convertida em glutathione oxidada (GSSG). A GSH é sintetizada no citosol e nos cloroplastos das células das plantas pela glutathione-sintetase (GS) e pela  $\gamma$ -glutamyl-cisteína-sintetase ( $\gamma$ -ECS). A produção e



manutenção da GSH pode ser realizada por síntese *de novo* ou por via de reciclagem pela GR, usando NADPH como cofator e dador de elétrons.

O balanço entre a GSH e GSSG é fundamental na manutenção do estado redox das células (Jozefczak et al., 2015). Devido ao seu poder redutor, a GSH tem uma importante função em vários processos biológicos como o crescimento e divisão celular, transdução de sinal, proteção de enzimas que contêm o grupo tiol (como as enzimas do Ciclo de Calvin), síntese de proteínas e ácidos nucleicos, precursor das fitoquelatinas (que são compostos cruciais na resposta das plantas a quantidades elevadas de metais pesados), destoxificação de xenobióticos e a ativação da expressão de genes de resposta ao stresse (Foyer et al., 1997; Jozefczak et al., 2012; Yadav, 2010).

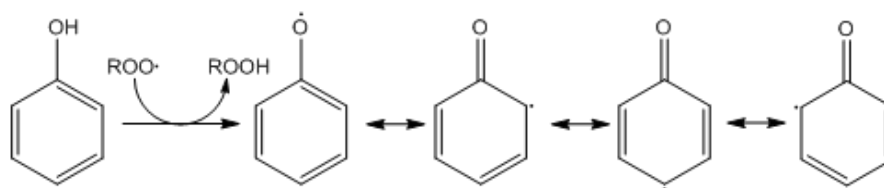
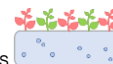
A glutatona é um importante antioxidante de baixo peso molecular (Noctor et al., 2011; Pivato et al., 2014), podendo reagir quimicamente com o  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e  $HO^{\bullet}$  e deste modo, atuar como um redutor, destoxificando radicais livres. Desta forma a GSH participa na proteção das macromoléculas e na regeneração de outros antioxidantes como o ASA, na via ASA-GSH (Jimenez et al., 1998; Jozefczak et al., 2014). A função da GSH como defesa antioxidante justifica o seu uso como marcador de stresse (Anjum et al., 2012; Hernández et al., 2015).

Os compostos fenólicos são vários metabolitos secundários que possuem propriedades antioxidantes e que se encontram de forma abundante nas plantas (Hernandez et al., 2009). Os compostos fenólicos estão divididos em não-estruturais (flavonóides, taninos, ésteres de hidroxycinamato e antocianinas) e estruturais (lenhina, suberina e outros polímeros estruturais). Os polifenóis são moléculas orgânicas que contêm um anel aromático com os grupos substituintes -OH ou -OCH<sub>3</sub> e que em conjunto contribuem para a sua atividade biológica.

Outros possíveis mecanismos antioxidantes dos polifenóis são a possibilidade de quelatar os metais, a inibição da xantina-oxidase e a influência nas diferentes fases da peroxidação lipídica (Agati et al., 2012; Arora et al., 2000). Os polifenóis apresentam a sua própria atividade antioxidante ou em conjugação com as peroxidases, especialmente os flavonóides e os fenilpropanóides que são preferencialmente oxidados em reações catalisadas por estas enzimas cujo objetivo é a destoxificação do  $H_2O_2$  produzido sob condições de stresse nas células (Mika et al., 2004).

Os radicais fenoxilo são, geralmente, menos reativos que os intermediários de oxigénio, evitando a formação de reações oxidativas resultantes. Neste sentido, os compostos fenólicos podem ter um efeito de pró-oxidantes (**Figura 5.4**).





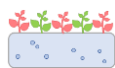
**Figura 5.4** - Representação esquemática da auto-oxidação dos fenóis.

O primeiro passo da auto-oxidação dos fenóis resulta na formação destes radicais e do radical  $O_2^{\bullet-}$ . Os radicais fenoxilo não reagem diretamente com o oxigênio, formam-se como produtos do metabolismo normal e na peroxidação lipídica (Jonsson et al., 1993). Os radicais fenoxilo podem ser reduzidos pelo ascorbato, através da enzima MDHAR, sendo reciclados noutros compostos fenólicos. A combinação da ação dos compostos fenólicos/ASA/POD permite formar um sistema antioxidante eficiente (Takahama e Oniki, 1997; van Doorn e Ketsa, 2014). O Zn, Ca, Mg e Cd têm sido referidos como estimulantes da indução do radical fenoxilo e da peroxidação lipídica (Llorach et al., 2008; Sakihama et al., 2002).

Os polifenóis demonstraram ter maior ação antioxidante que outros compostos, como o ASA e o  $\alpha$ -tocoferol, devido à sua elevada capacidade para doar elétrons (Araceli et al., 2009). Existem algumas evidências da indução do metabolismo dos compostos fenólicos nas plantas como resposta a múltiplos stresses (Dixon e Paiva, 1995; Jaakola et al., 2004; Michalak, 2006; Pawlak-Sprada et al., 2011). Por exemplo, Lukaszewicz et al. (2004) observaram que batata transgênica com uma concentração superior de flavonóides demonstrou ter uma capacidade antioxidante maior.

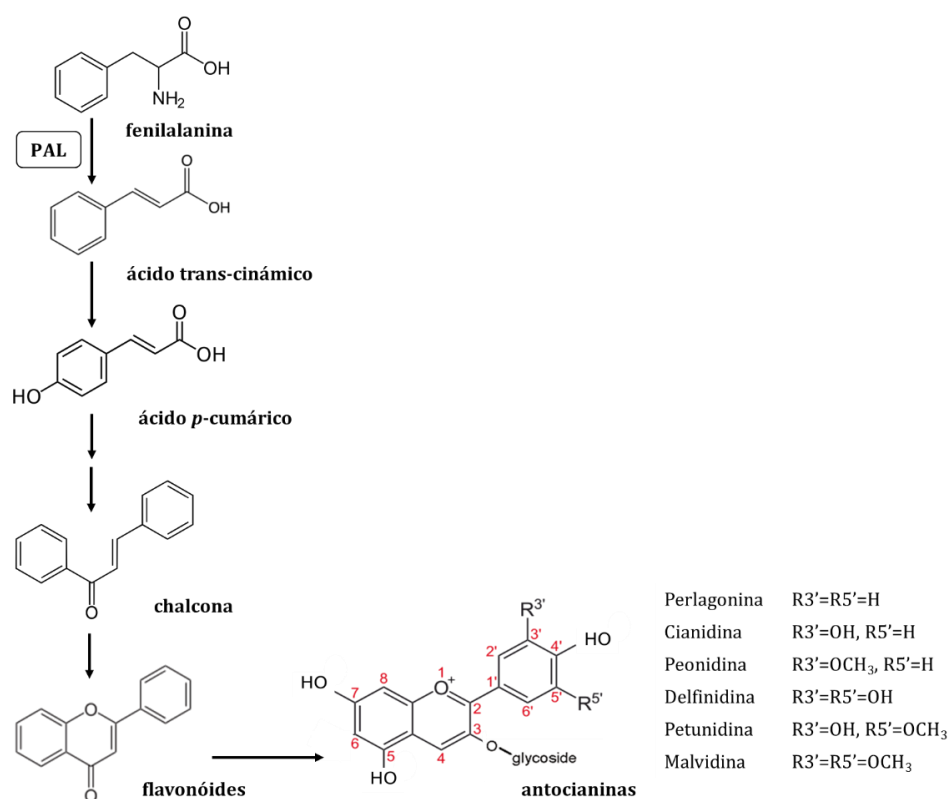
As antocianinas são pigmentos naturais e, quimicamente, são uma subclasse dos flavonóides e resultam da associação das antocianidinas a glúcidos por ligação glucosídica (Kitamura et al., 2002). Estes pigmentos são produzidos no citosol e depois transportados até aos vacúolos (Kahkonen e Heinonen, 2003).

As antocianinas desempenham um papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes, estando relacionadas com os processos que envolvem a destoxificação do  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  (Dai et al., 2012b; Kahkonen e Heinonen, 2003; Mobin e Khan, 2007). A cianidina-3-glucósido é a antocianina mais comum encontrada na natureza (Lee et al., 2005b) e a que aparece em maior quantidade na alface avermelhada (Becker et al., 2014; Mulabagal et al., 2010). Neill e Gould (2003) referiram que a cianidina-3-glucósido pode atuar como antioxidante, sendo muito eficaz na destoxificação do  $O_2^{\bullet-}$ , ou funcionar como um protector do sistema fotossintético. As antocianinas também atuam na quelatação de metais (Cooper-Driver, 2001; Gülçina et al., 2005) e inibem a peroxidação lipídica (Mulabagal et al., 2010).



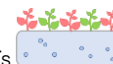
A fenilalanina-amonialase (PAL, EC 4.3.1.5) é uma enzima chave no metabolismo dos compostos fenólicos e que tem sido referida por estar relacionada com os processos de proteção das plantas em condições de stresse através da síntese de vários compostos fenilpropanóides como fenóis, antocianinas, flavonóides e lenhina (Cooper-Driver, 2001; Oh et al., 2009b; Winkel-Shirley, 2002).

A PAL é a enzima que catalisa a eliminação de azoto (na forma de amoníaco, NH<sub>3</sub>) a partir da L-fenilalanina para originar ácido trans-cinâmico. As reações seguintes produzem derivados específicos da via, como os flavonóides e as antocianinas (**Figura 5.5**).



**Figura 5.5** – Representação esquemática da via fenilpropanóide na síntese de flavonóides e antocianinas. Fonte: adaptado de Cooper-Driver (2001); Lee et al. (2005a) e (Winkel-Shirley, 2002).

O efeito da presença de stresses com influência na atividade da PAL tem sido referido por vários autores (Boo et al., 2011; Dai et al., 2006; Dixit et al., 2001; Luna et al., 2012; Oh et al., 2009a; Pawlak-Sprada et al., 2011; Ramakrishna e Ravishankar, 2011; Schutzendubel et al., 2001). Um aumento nos níveis da atividade da PAL e, consequentemente, da síntese de antocianinas e compostos fenólicos, está relacionada com o aumento da capacidade antioxidante da planta (Chon et al., 2012).

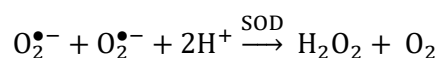


#### 5.2.4.2. Mecanismos de defesa enzimáticos

Os mecanismos enzimáticos são vias enzimáticas específicas que atuam de forma direta na remoção de ROS, usando-as como substrato, ou que regeneram moléculas eficientes na destoxificação das ROS. Estas enzimas atuam em diferentes compartimentos celulares e a sua resposta é realizada de forma concertada quando as células são expostas a stresse oxidativo.

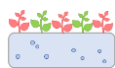
A superóxido-dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) tem uma importante função na defesa contra o stresse oxidativo em todos os organismos aeróbios, estando presente na maior parte dos compartimentos celulares que produzem formas ativas de oxigénio (Scandalios, 1993). As SODs são metaloenzimas por apresentarem no seu centro ativo um metal de transição como o cobre, zinco, manganês ou ferro. Nas plantas são conhecidas três classes de SODs, dependendo do metal que exerce a sua função de cofator (del Rio et al., 1998; Rubio et al., 2002): (1) as Cu/ZnSOD com Cu(II) e Zn(II) no centro ativo e que se encontram geralmente no citosol, cloroplasto, peroxissomas e mitocôndria (Bowler et al., 1992); (2) as MnSOD constituídas por Mn(III) e que estão presentes na mitocôndria e nos peroxissomas; (3) as FeSOD que têm Fe(III) como cofator e estão nos cloroplastos (Jackson et al., 1978).

Nas plantas, tem-se verificado que a atividade da SOD aumenta em resposta à exposição a vários stresses ambientais (Alscher et al., 2002; Cuypers et al., 2011; Martins et al., 2014; Yu et al., 2012), e que este aumento está frequentemente relacionado com o aumento da tolerância da planta (Gill et al., 2015b). A atuação da superóxido-dismutase é a primeira via de defesa dos mecanismos enzimáticos para a eliminação/remoção das ROS. Esta enzima catalisa a reação de eliminação do  $O_2^{\bullet-}$  através da seguinte reação de dismutação:



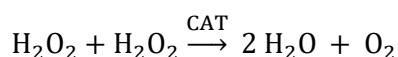
A dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$  pela SOD não é suficiente para a eliminação completa do efeito indesejável das ROS, pois o  $H_2O_2$  resultante é ele próprio um oxidante, pelo que é posteriormente eliminado por outros sistemas enzimáticos, como é o caso da CAT e de peroxidases (PODs), que catalisam a redução do  $H_2O_2$  em  $H_2O$ .

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é uma enzima tetramétrica com um grupo ferro-heme no centro ativo. Esta enzima encontra-se maioritariamente localizada nos peroxissomas, embora não exclusivamente, e tem a particularidade de atuar sobre o  $H_2O_2$  antes que este se difunda para as outras partes da célula, embora existam estudos que referem que a CAT pode estar presente em menor grau no citosol, cloroplasto e mitocôndria (Mhamdi et al., 2010; Schrader



e Fahimi, 2004). Apesar de a CAT ser responsável pela eliminação de elevadas quantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como a sua localização principal é nos peroxissomas, limita a sua capacidade para manter os teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  baixos e restringe também a capacidade de prevenir danos noutros compartimentos celulares, como nos cloroplastos.

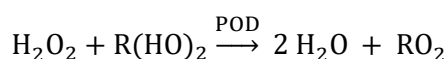
A CAT é a única enzima que degrada  $\text{H}_2\text{O}_2$  sem consumir equivalentes redutores da célula, conferindo à célula um mecanismo eficiente de remoção deste substrato (Gechev et al., 2006; Scandalios, 2005):



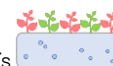
Estas enzimas têm elevadas taxas catalíticas, mas uma baixa afinidade para o substrato, uma vez que a reação precisa de duas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . De facto, verifica-se que a resposta da CAT face aos stresses ambientais é ambígua, dependendo da intensidade, duração e tipo de stresse (Anderson, 2002; Sharma e Dubey, 2005a). A sobreexpressão de um gene da CAT em *Brassica juncea*, aumentou a tolerância das plantas de tabaco ao stresse oxidativo induzido por Cd (Guan et al., 2009).

A guaiacol-peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) oxida preferencialmente um dador de eletrões de características aromáticas, como o guaiacol ou o pirogalhol à custa do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estas enzimas contêm 4 pontes dissulfito e 2 iões  $\text{Ca}^{2+}$  estruturais (Schuller et al., 1996). Existem várias isoenzimas da POD em vacúolos, na parede celular e no citosol (Asada, 1992). A POD está associada a vários processos biossintéticos, incluindo a lenhificação da parede celular, a biossíntese de etileno e a defesa contra stresses bióticos e abióticos.

Tal como foi referido, as peroxidases são uma alternativa na eliminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  dado que apresentam uma maior afinidade para este substrato do que a CAT. As PODs têm a particularidade de, após a conversão do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , conseguirem convertê-lo em água, com a utilização de um agente redutor:

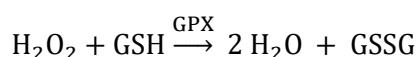


Apesar de a CAT ser mais ativa em condições de stresse, as PODs protegem as células quando ocorrem níveis mais baixos de stresse oxidativo (Mates, 2000). As plantas são ricas nestas oxirredutases que removem o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , utilizando-as para oxidar um 2º substrato. Muitas peroxidases presentes nas plantas não são específicas, utilizando diversos substratos como agentes redutores pois o agente oxidante é sempre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Halliwell, 2006). O aumento da atividade das PODs tem sido um dos mecanismos de defesa e de tolerância usado para

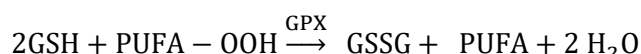


remover o excesso de  $H_2O_2$  em stresses ambientais (Mozafariyan et al., 2016; Rodríguez-Verástegui et al., 2015; Shah e Nahakpam, 2012; Tang et al., 2012; Verma e Dubey, 2003). Radotic et al. (2000) relacionaram um aumento na atividade da POD devido à presença de metais e sugeriram que esta enzima pode ser induzida pela toxicidade de metais em plantas pelo que apresenta um grande potencial como biomarcador de stresse.

As glutathionas-peroxidases (GPXs, EC 1.11.1.9) são uma família de múltiplas isoformas que pertencem à classe das oxirredutases e apresentam um centro ativo composto por selénio-cisteína (Se–cys) (Bela et al., 2015; Passaia e Margis-Pinheiro, 2015). Esta enzima compete com a CAT pelo  $H_2O_2$  e utilizam como agente redutor um substrato, que difere conforme o tipo de peroxidase, no caso da GPX é utilizada a GSH:



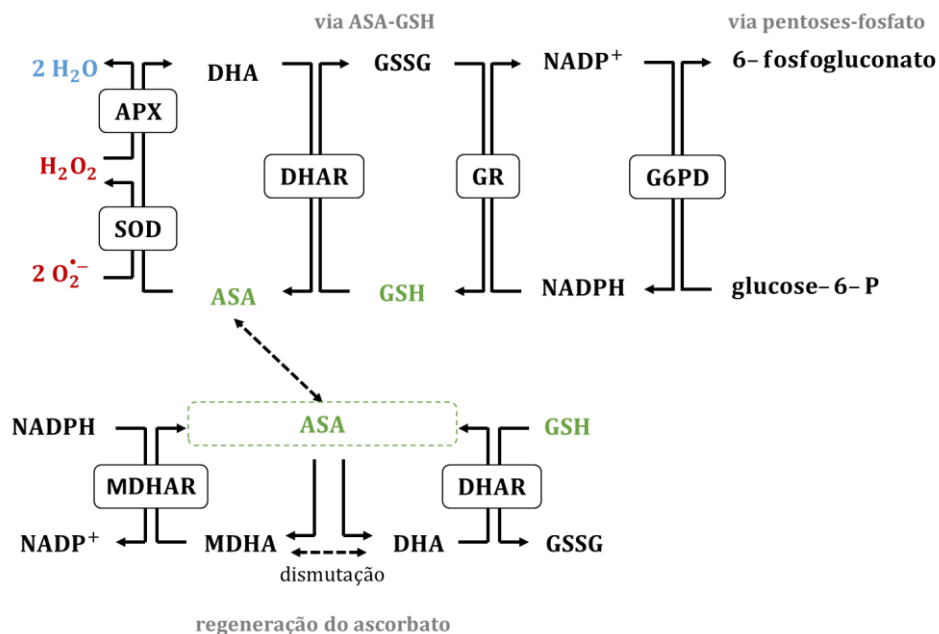
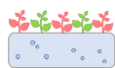
A GPX também pode atuar na remoção dos produtos resultantes da peroxidação dos lípidos, decompondo os hidroperóxidos em água (ou álcool) (Ahmad et al., 2008):



As alterações na razão forma reduzida/oxidada, tais como, ASA/desidroascorbato (DHA) e GSH/GSSG, são cruciais para a célula detetar a presença de stresse oxidativo e responder de forma concordante. A via ASA-GSH, também conhecido como via ascorbato-glutationa ou Halliwell-Asada, consiste em vias de regeneração de ASA e GSH que destoxificam as ROS. Na **Figura 5.6** encontra-se representado a via ASA-GSH.

Ao contrário das enzimas antioxidantes referidas anteriormente, que utilizam agentes redutores específicos, as enzimas da via ASA-GSH utilizam como agente redutor os eletrões, direta ou indiretamente, provenientes do NADPH. Este ciclo envolve sucessivas reações de oxidação e redução do ASA, GSH e NADPH catalisado por enzimas como a APX, MDHAR, DHAR e GR. Estas atuam de forma integrada na redução do  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e, na regeneração de moléculas para a destoxificação das ROS, como a glutathiona e o ascorbato.

Este ciclo está presente em 4 diferentes compartimentos celulares incluindo o citosol, cloroplasto, mitocôndria e peroxissomas (Jimenez et al., 1997). A via ASA-GSH tem uma importante função em combater o stresse oxidativo induzido por condições ambientais (Drazkiewicz et al., 2003; Martins et al., 2011; Pereira et al., 2002; Pérez-Chaca et al., 2014; Sharma e Dubey, 2005a).

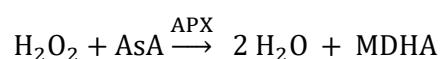


**Figura 5.6** – Representação esquemática da via ascorbato-glutationa (ou ciclo Halliwell-Asada). Fonte: adaptado de Foyer e Noctor (2009).

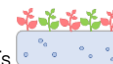
A verde estão representados os compostos ativos na defesa; a vermelho os compostos que são adversos; a azul os compostos formados que não são prejudiciais.

A ascorbato-peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) é a principal enzima da via ASA-GSH, sendo responsável pela destoxificação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  no citosol, cloroplasto, mitocôndria e peroxissomas (Madhusudhan et al., 2003; Nakano e Asada, 1987; Sharma e Dubey, 2004). Em particular, esta enzima tem um papel importante nos cloroplastos que são desprovidos de CAT e são a maior fonte de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , devido às reações que correm durante a fotossíntese (Noctor e Foyer, 1998).

Estas enzimas pertencem à família das peroxidases com grupos heme e são reguladas através do estado redox das células e concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no meio (Welinder, 1992). As APX apresentam uma maior afinidade para este substrato que as enzimas CAT e POD (Ahmad et al., 2008). Este tipo de peroxidase catalisa a conversão do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$ , usando o ASA como dador específico de elétrons:



Vários autores reportaram um aumento de atividade da APX durante uma resposta a um stresse abiótico (Ahmad et al., 2010; Blasco et al., 2015; Gusman et al., 2013; Zhang et al., 2016).



O ASA atua na destoxificação do  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , pois tem a capacidade de se oxidar, dando origem ao monodesidroascorbato (MDHA) e ao desidroascorbato (DHA). O ASA pode ser reduzido diretamente pelo NADPH na reação catalisada pela monodesidroascorbato-redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4) ou usando a glutatona como agente redutor, na reação catalisada pela desidroascorbato-redutase (DHAR, EC 1.8.5.1). O dador de elétrons na redução do ASA, para além do NADPH, pode ser o citocromo ou a ferredoxina, dependendo do compartimento celular em que ocorre, mitocôndria ou cloroplastos, respetivamente (Noctor e Foyer, 1998).

Apesar de o ASA poder ser regenerado diretamente a partir do MDHA, a rápida dismutação do MDHA significa que algum DHA está sempre a ser produzido quando o ascorbato está a ser oxidado nas folhas ou noutros tecidos. Isto acontece porque o MDHA tem um período de vida curto e pode espontaneamente originar o DHA e ASA por dismutação ou é reduzido a ASA pelo NADPH através da MDHAR.

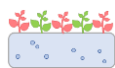
A glutatona-redutase (GR, EC 1.8.1.7) é uma flavoproteína que contem um grupo dissulfito (Ghisla e Massey, 1989) sendo fundamental na via ASA-GSH, na qual o ascorbato e glutatona não se consomem, e são constantemente regenerados à custa do NADPH (Noctor e Foyer, 1998). É uma enzima chave na defesa antioxidante porque tem a particularidade de manter a razão GSH/GSSG elevada. No ciclo ASA-GSH, a GSH é oxidada em GSSG pela DHAR. A GR catalisa a redução da GSSG em GSH, utilizando como potencial redutor das células o NADPH produzido na via das pentoses na reação catalisada pela glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD, EC 1.1.1.49).

Apesar de estar localizada em diversos compartimentos celulares (cloroplasto, citosol, mitocôndria e peroxissomas), cerca de 80 % da atividade da GR ocorre em tecidos fotossintéticos (Edwards et al., 1990). A presença de GR nos cloroplastos garante níveis elevados de GSH que são fundamentais na regeneração do ASA que existe nos cloroplastos (Mittler, 2002), estando envolvida na destoxificação do  $H_2O_2$ .

Vários autores referem a influência da atividade da GR na resposta da planta sob diferentes stresses ambientais (Amjad et al., 2016; Hernández et al., 2001; Khan et al., 2015; Le Martret et al., 2011; Maheshwari e Dubey, 2009; Sharma e Dubey, 2005a). Por exemplo, uma expressão em excesso de GR em plantas de *N. tabacum* originou um teor de ASA elevado e aumentou a tolerância ao stresse oxidativo (Aono et al., 1993).

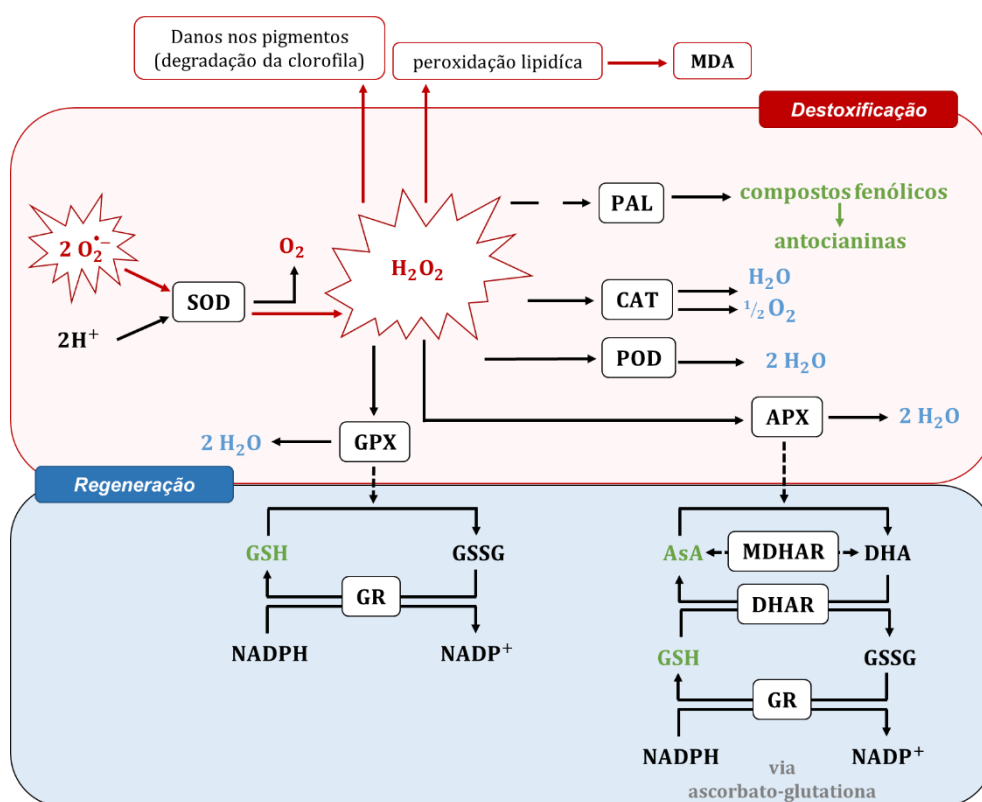
A resposta da planta face à exposição a EPTs varia e depende da espécie da planta, tecido, estado de desenvolvimento, tipo de metal e da sua concentração. Uma das respostas chave inclui desencadear uma série de mecanismos de defesa que envolvem componentes





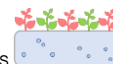
enzimáticos e não-enzimáticos (Armas et al., 2015; Gratão et al., 2005; Martins et al., 2013; Moreira et al., 2015; Pinto et al., 2017).

O aumento na atividade de enzimas antioxidantes em plantas sujeitas a condições de stresse provocadas por iões metálicos parece ser um importante mecanismo de defesa para combater os danos oxidativos (Apel e Hirt, 2004). Contudo, em certas situações a ativação de enzimas antioxidantes em resposta ao stresse induzido por metais pode não ser suficiente para conferir tolerância à acumulação de metais (Giannakoula et al., 2010). Uma vez que existe complexidade nos sistemas de destoxificação das ROS, vários estudos demonstraram que a expressão simultânea de múltiplas enzimas antioxidantes demonstrou ser mais eficaz no desenvolvimento de plantas transgênicas com maior tolerância a múltiplos stresses ambientais (Kwon et al., 2002; Lee et al., 2007; Lim et al., 2007). Na **Figura 5.7** encontram-se esquematizados os vários mecanismos enzimáticos que ocorrem nas células, a forma como atenuam o efeito das ROS (destoxificação) e, como são regenerados os mecanismos não-enzimáticos (regeneração), nomeadamente, através do ciclo ASA-GSH.



**Figura 5.7** – Visão geral do sistema de defesa antioxidante nas plantas. Fonte: adaptado de Foyer e Noctor (2009) e Groß et al. (2013).

A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a azul os compostos formados que não são prejudiciais.

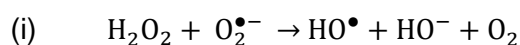


### 5.2.5. Mecanismos de atuação dos metais pesados

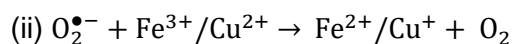
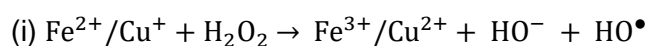
Os metais podem ter diferentes modos de ação no sistema biológico das plantas pelo que podem ser divididos em dois grupos: os que promovem reações redox e os que não são ativos em reações de oxidação-redução. Existem três tipos de mecanismos de atuação dos metais pesados nas células (Schutzendubel e Polle, 2002; Sytar et al., 2013) que afetam a integridade das membranas e resultam na inibição de processos vitais das plantas:

- (i) produção das ROS através de vias de auto-oxidação ou reações Fenton;
- (ii) bloqueio de grupos funcionais;
- (iii) substituição de íons metálicos nas biomoléculas.

Os metais como o Cu, Cr, ou o Fe catalisam reações de oxidação-redução e induzem a produção direta das ROS através das reações redox como as reações de Haber-Weiss e Fenton (Romero-Puertas et al., 2012) e também causam diretamente danos celulares. A reação de Haber-Weiss (i) produz  $\text{HO}^\bullet$  diretamente a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ :

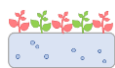


A reação de Fenton é catalisada por metais de transição que promovem reações de oxidação induzindo a conversão do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{HO}^\bullet$  (i). A redução dos íons metálicos pode ser alcançada pela subsequente reação com o radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (ii):



A formação do radical  $\text{HO}^\bullet$  pelas reações de Fenton e Haber-Weiss (Mithofer et al., 2004), pode ser evitada mantendo baixa a concentração de metais nas células (Møller et al., 2007). Estes elementos podem originar diretamente danos oxidativos levando à produção das ROS, resultando no desequilíbrio homeostase celular.

Os metais não redox, tais como o Cd, Pb, Ni, Zn, indiretamente, originam stresse oxidativo por meio de múltiplos mecanismos, entre eles (i) a diminuição do teor de glutathione, (ii) a ligação a grupos sulfidrilo de proteínas (Valko et al., 2005), (iii) a inibição de enzimas antioxidantes ou indução de enzimas produtoras de ROS, como a NADPH oxidase (Bielen et al., 2013), (iv) a ocorrência de danos moleculares nas células, direta ou indiretamente,



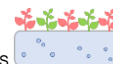
podendo, por exemplo, reagir com os AGIs e promover a peroxidação lipídica, com a consequente destruição de membranas biológicas (Apel e Hirt, 2004).

Quando uma planta é sujeita a um dado stresse, como a exposição a metais pesados, a produção de ROS pode exceder a sua capacidade de remoção, resultando em níveis mais elevados que causam danos oxidativos (Kumar et al., 2015). A maior parte das plantas tem mecanismos específicos que atuam na restrição da absorção de dado metal ou possuem eficientes sistemas antioxidantes, que mantêm as concentrações destes radicais em níveis razoáveis para evitar e/ou diminuir os seus efeitos oxidativos nos compartimentos celulares (Gupta et al., 2013; Singh et al., 2015), tal como já foi referido anteriormente. A aptidão da planta em melhorar a sua capacidade de eliminar estas espécies traduz-se numa maior tolerância a dado stresse

#### **5.2.5.1. Cádmio**

Nas plantas, o Cd é tóxico e é facilmente absorvido pelas raízes e translocado para a parte aérea, inibindo o seu crescimento, por interferência com diferentes processos metabólicos, como a assimilação e transporte da água e de diversos nutrientes (Gill et al., 2012). Em particular, a absorção de iões  $\text{Cd}^{2+}$  parece competir com os mesmos transportadores de outros nutrientes como o Ca, Fe, Mn, Mg e Zn (Clemens, 2006; Gallego et al., 2012), bem como de K, Cu e Ni (Sanita di Toppi e Gabbrielli, 1999), provocando a sua deficiência. De facto, alguns destes nutrientes inibem a absorção e acumulação de Cd pela raiz (Zhao et al., 2006). Por exemplo, os níveis de Ca afetam a absorção de Cd porque este compete com o Ca pelos seus canais de absorção, bem como uma concentração baixa de Ca numa solução diluída de Hoagland favorece a entrada de Cd (Wojas et al., 2007). Por outro lado, danos nas raízes ou inibição do crescimento da planta são favorecidas pela presença de Cd, causando uma diminuição na absorção de nutrientes como o Fe, Ca e Mn (Siedlecka, 1995).

A exposição ao Cd resulta numa diminuição na biossíntese de clorofila, interferindo com os processos fotossintéticos (Irfan et al., 2013; Khan et al., 2007; Mohamed et al., 2012), mas geralmente é necessária uma elevada concentração de Cd para que sejam detetados efeitos visíveis (Redondo-Gómez et al., 2010; Roychoudhury et al., 2012). Esta diminuição no teor de clorofilas pode estar relacionada com a inibição da sua produção ou com a sua degradação, resultante das carências de Mg e Fe. DalCorso et al. (2008) referiram que o Cd tem efeitos negativos no metabolismo da clorofila e que as cloroses podem surgir por alterações na razão Fe/Zn.



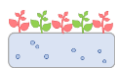
A principal causa da toxicidade do Cd é a sua grande afinidade com os grupos tiol (-SH) das enzimas e outras proteínas (Benavides et al., 2005), afetando a sua atividade. Por exemplo, o Cd pode substituir o Zn, Fe e Mn na SOD, e deste modo diminuir a sua atividade devido às suas propriedades químicas semelhantes para substituir estes cátions essenciais nos seus locais ativos (DalCorso et al., 2008). A GSH é também um alvo dos iões  $\text{Cd}^{2+}$  (Cuypers et al., 2010) e na resposta ao stresse induzido pelo Cd, a GSH tem um duplo papel, neutraliza as ROS mas também atua diretamente na sequestração do Cd livre, prevenindo a sua atuação com outros alvos celulares críticos que possuam grupos tiol (Sobrinho-Plata et al., 2014).

O Cd é um metal pesado sem função biológica conhecida e que não origina radicais livres diretamente. Contudo, a produção das ROS, após a exposição a Cd, tem sido referida em vários estudos (Andresen et al., 2016; Cho e Seo, 2005; Keunen et al., 2011; Schutzendubel et al., 2001). Em condições fisiológicas normais, o Cd não catalisa reações redox nos sistemas biológicos. No entanto, foi demonstrado que o Cd aumenta a concentração de Fe livre, possivelmente pela sua substituição em várias proteínas e, por consequência, aumenta a quantidade de metais livres que podem promover reações redox, que originam a produção de  $\text{H}_2\text{O}^\bullet$  através das reações de Fenton (Cuypers et al., 2010). Um aumento da peroxidação lipídica depois da exposição ao Cd é outro dos efeitos do stresse oxidativo causado por este metal (Jurczuk et al., 2004). Também têm sido descritos efeitos nos níveis de atividade enzimática, como a inibição ou indução das enzimas associadas aos mecanismos de resposta ao stresse oxidativo induzido pelo Cd (Gratão et al., 2005; Martins et al., 2011; Milone et al., 2003).

#### 5.2.5.2. Crómio

O Cr pode promover o crescimento de certas plantas em baixas concentrações (Shanker et al., 2009), embora seja muito fitotóxico em elevadas concentrações. Nas plantas, estes efeitos incluem a inibição do desenvolvimento da planta, com uma diminuição da biomassa, indução de cloroses devido à degradação da clorofila, destruição de membranas lipídicas e danos no DNA.

O Cr não é um elemento essencial para as plantas, pelo que não existem mecanismos de absorção. A absorção de nutrientes é muito afetada na presença de Cr, devido à sua estrutura semelhante com outros elementos essenciais. O Cr entra na planta através dos transportadores de substâncias essenciais como o sulfato. De facto, o  $\text{CrO}_4^{2-}$  é quimicamente muito semelhante ao  $\text{SO}_4^{2-}$  sendo por isso, translocados através da membrana pelos mesmos transportadores. Assim, a presença de S no meio diminui a absorção de Cr pelas plantas,



porque ambos competem pelo mesmo transportador (Cervantes et al., 2001; Shanker et al., 2005). Este elemento também interfere com a absorção de outros nutrientes essenciais tais como o N, P, K, B, Mg, Ca, Mn, Zn e Cu (Ahmad et al., 2011; Chatterjee e Chatterjee, 2000; Davies et al., 2002; Dube et al., 2003; Liu et al., 2008; Moreira et al., 2005; Vernay et al., 2007).

O Cr, ao contrário dos outros EPTs em estudo, apresenta propriedades redox (Singh et al., 2013), sendo um agente oxidante. Neste sentido, o stresse induzido pelo Cr leva à produção direta de ROS como o  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$  (Gangwar e Singh, 2011; Pandey et al., 2009), através das reações de Fenton. A redução do Cr (IV) a Cr (III) também leva à produção de ROS (Kotas e Stasicka, 2000).

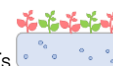
As alterações metabólicas devido à presença de Cr têm um efeito direto nas enzimas e/ou nos metabolitos antioxidantes (Bah et al., 2011; Chatterjee e Chatterjee, 2000; Dazy et al., 2008; Dhir et al., 2009; Shanker et al., 2004) e na produção das ROS, resultando em peroxidação lipídica e danos oxidativos (Hayat et al., 2012; Montes-Holguin et al., 2006; Pandey et al., 2005; Shanker e Pathmanabhan, 2004).

O Cr pode também provocar alterações na produção de pigmentos, tais como a clorofila e antocianinas (Boonyapookana et al., 2002). Como o Cr interfere com a absorção de Fe, diminui a sua acumulação que é necessária para a biossíntese de clorofila, levando ao aparecimento de cloroses (Gopal et al., 2009). Vários estudos referem uma diminuição no teor de clorofila total, clorofila a e clorofila b (Redondo-Gómez et al., 2011; Vajpayee et al., 2000), podendo também estar relacionado com a diminuição na absorção de Mg e N, que são componentes importantes na molécula de clorofila.

A presença de Cr também induz a produção ou inibição de enzimas antioxidantes (Bah et al., 2011; Diwan et al., 2010; Terzi e Yildiz, 2014; Zeng et al., 2014). Apesar de existirem estudos que mostram que o Cr induz a oxidação dos grupos tiol, presentes na GSH (Pandey et al., 2009), outros estudos referiram que a via ASA-GSH é fundamental na defesa contra stresses induzidos pelo Cr (Qiu et al., 2013; Shanker et al., 2004).

### 5.2.5.3. Chumbo

Nas plantas, o Pb é fitotóxico e não apresenta atividade biológica conhecida. Neste sentido, uma acumulação excessiva de Pb origina uma diminuição da biomassa, inibição da biossíntese de clorofila, alterações na absorção de nutrientes e tem efeito nas reações enzimáticas, bem como outros efeitos adversos. A intensidade destes efeitos varia conforme



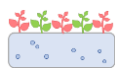
o tempo de exposição, o estado de desenvolvimento da planta, o órgão em estudo e a concentração de Pb exposta (Sharma e Dubey, 2005b).

A absorção de nutrientes é significativamente afetada pela presença de Pb (Gopal e Rizvi, 2008). A exposição ao Pb diminui a concentração de cátions divalentes como o Zn, Mn, Mg, Ca e Fe (Kopittke et al., 2007b; Qiao et al., 2015; Sinha et al., 2006). Contudo, esta diminuição pode resultar do bloqueio da absorção pela raiz, diminuição da translocação das raízes para a parte aérea ou uma alteração na distribuição desses elementos na planta. Esta diminuição na absorção de nutrientes na presença de Pb resulta da competição ou alterações fisiológicas na atividade da planta (Sharma e Dubey, 2005b).

A inibição da fotossíntese é outro sintoma causado pela toxicidade com Pb (Cenkci et al., 2010; Piotrowska et al., 2009; Singh et al., 2010). A degradação da clorofila deve-se ao desequilíbrio na absorção de nutrientes como o Mg e Fe (Gopal e Rizvi, 2008) e a substituição de íons divalentes pelo Pb (Gupta et al., 2009). Geralmente, a clorofila b é mais sensível que a clorofila a (Xiong et al., 2006).

O Pb, apesar de ser um metal sem propriedades redox, tem a particularidade de induzir a produção de ROS (Gupta et al., 2013; Pourrut et al., 2008; Singh et al., 2010; Yadav, 2010). O Pb causa alterações significativas na composição lipídica de várias membranas celulares e induz a peroxidação lipídica (Singh et al., 2010). Os efeitos do stresse oxidativo causado pelo Pb podem ser diminuídos pela GSH, por esta actuar na destoxificação das ROS (Liu et al., 2009b; Verbruggen et al., 2009). Gupta et al. (2010) referiram que a GSH teve um importante papel na destoxificação de Pb em *S. alfredii* sob condições de stresse em que a produção das PCs não foi estimulada.

A toxicidade induzida pelo Pb pode causar inibição da atividade de enzimas antioxidantes ou induzir a sua síntese (Bah et al., 2011; Gupta et al., 2010; Mishra et al., 2006; Srivastava et al., 2014). De facto, a inibição ou indução enzimática parece estar relacionada com o tipo de metal, a forma específica do metal, espécie da planta e duração/intensidade do stresse (Gupta et al., 2009; Islam et al., 2007; Singh et al., 2010). Normalmente, o Pb inibe a atividade enzimática devido à sua grande afinidade com o grupo -SH (Sharma e Dubey, 2005b), reagindo rapidamente com estes grupos ligando-se aos resíduos de cisteína, o que leva à quebra da estrutura e, por consequência, a função de numerosas proteínas, incluindo enzimas, é afetada. O Pb pode ter o mesmo efeito através da sua ligação aos grupos -COOH das proteínas (Gupta et al., 2010; Gupta et al., 2009). O Pb também interage com enzimas que contêm grupos metálicos, uma vez que prejudica a absorção de nutrientes como Zn, Fe



e Mn que são essenciais para essas enzimas. Para além disso, podem substituir estes elementos metálicos e, deste modo, inativar essas enzimas (Cenkci et al., 2010). Um aumento na produção de enzimas antioxidantes em excesso poderá ser uma resposta da planta como consequência da toxicidade do Pb no meio. Este aumento pode também estar relacionada com o aumento das concentrações dos seus substratos (Islam et al., 2007).

#### 5.2.5.4. Níquel

O Ni em quantidades adequadas apresenta uma função vital em vários processos fisiológicos, desde a germinação até à planta adulta, logo as plantas não conseguem completar o seu ciclo sem a acumulação adequada deste nutriente. O metabolismo deste elemento é fundamental na atividade de várias enzimas, na manutenção do estado redox celular adequado e várias outras repostas bioquímicas e fisiológicas (Seregin e Kozhevnikova, 2006).

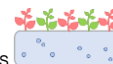
Apesar disto, em níveis elevados tem a particularidade de afetar várias atividades metabólicas, como a absorção de outros nutrientes, inibição enzimática, desequilíbrios no processo fotossintético levando à degradação de clorofila e, consequentemente, à diminuição do rendimento das plantas. Este excesso de Ni origina stresse oxidativo nas plantas que está relacionado com os efeitos tóxicos causados pela sua presença, como a produção de elevadas quantidades de ROS, peróxidos lipídicos que causam danos oxidativos em vários organelos celulares e no DNA e a oxidação de proteínas (Yusuf et al., 2011).

O Ni apresenta propriedades químicas semelhantes ao Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn, e por isso compete com estes elementos na absorção, acumulação e utilização pela planta (Chen et al., 2009; DalCorso et al., 2014). Na presença de Ni, os teores de outros nutrientes podem aumentar, diminuir ou não se alterar (Seregin e Kozhevnikova, 2006). Khan e Khan (2010) referiram que o excesso de Ni compete com vários catiões, em particular, com o Mg, Fe e Zn, impedindo que estes sejam absorvidos pela planta, o que resulta em deficiências nestes nutrientes, substituições na molécula de clorofila e o aparecimento de cloroses.

O Ni também pode substituir o Mg em enzimas como a Rubisco (Yusuf et al., 2011) e na molécula de clorofila, alterando a sua estrutura e atividade. A toxicidade induzida por Ni também diminui a síntese de clorofila total, clorofila a e b e a razão clorofila a/b (Gajewska et al., 2006), inibindo a fotossíntese (Boisvert et al., 2007).

A exposição a um excesso de Ni tem a capacidade de produzir  $\text{HO}^\bullet$ , através das reações de Fenton/Haber-Weiss (Kehrer, 2000), sendo um catalisador eficaz desta reação (Leonard et





al., 2004). Neste sentido, Boominathan e Doran (2002) referiram que o Ni induz a formação indireta de  $H_2O_2$ ,  $HO^\bullet$  e  $O_2^{\bullet-}$  em várias plantas.

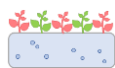
O Ni pode induzir a diminuição no teor de GSH e a inibição de enzimas antioxidantes, especialmente a GR. A atividade da GR, em resposta a um stresse induzido por Ni, depende da dose e é variável ao longo do tempo. O Ni induziu uma diminuição na atividade enzimática da GR em plantas resistentes ao Ni, por outro lado não se observaram diferenças significativas em plantas sensíveis a este elemento (Randhawa et al., 2001). Vários estudos foram realizados em plantas para avaliar o efeito do Ni na produção das ROS e na atividade enzimática de enzimas e metabolitos antioxidantes (Baccouch et al., 2001; Rao e Sresty, 2000). Seregin e Kozhevnikova (2006) atribuíram estas alterações nas atividades enzimáticas devido ao efeito direto da presença de Ni como a sua ligação a grupos -SH ou histidina, substituição nos centros ativos de metaloenzimas, ou indiretamente quando afeta reações de expressão de genes.

#### 5.2.5.5. Zinco

O Zn é um nutriente essencial para a planta, sendo necessário para o normal funcionamento do metabolismo celular bem como para o crescimento da planta (Broadley et al., 2007). É um cofator de várias enzimas, estando envolvido em vários processos fisiológicos como o metabolismo dos glúcidos, lípidos e ácidos nucleicos, na expressão e regulação de genes, ativação enzimática, síntese proteica e desenvolvimento reprodutivo (Cakmak, 2000; Santos, 2002).

A presença de Zn interfere com a absorção de Pb e Cd de meios contaminados, devido às propriedades químicas semelhantes (Siedlecka, 1995). O Zn também interfere com a absorção de Mg e Fe (Sagardoy et al., 2009), pelo que os sintomas iniciais do excesso de Zn incluem cloroses visíveis nas folhas, induzida pela deficiência destes elementos e pela sua substituição na molécula de clorofila por Zn.

O Zn desempenha um duplo papel na indução do stresse oxidativo nas plantas. O Zn em excesso é tóxico e embora seja um metal não redox, pode originar indiretamente ROS e induzir enzimas antioxidantes, tais como, SOD, CAT e GPX (Lin e Aarts, 2012). Vários estudos referem a influência do Zn na atividade enzimática de enzimas e metabolitos antioxidantes não-enzimáticos que determinam a tolerância ao stresse oxidativo (Morina et al., 2010; Sytar et al., 2013; Wang et al., 2009). Outro estudo sugeriu que a GSH é uma molécula fundamental na tolerância da planta face ao stresse oxidativo induzido por Zn (Nocito et al., 2006). A



presença de quantidades excessivas de Zn também origina um aumento da peroxidação lipídica (Ben Ghnaya et al., 2009; Michael e Krishnaswamy, 2011). Por outro lado, é também um cofator de enzimas importantes na defesa antioxidante como a Cu/ZnSOD.

### 5.3. Material e métodos

#### 5.3.1 Material Vegetal

Nestes ensaios optou-se por apenas utilizar uma cultivar, a alface M4E de folha avermelhada (2.1.1.) por apresentar na sua constituição compostos fenólicos, como as antocianinas, que podem ser mais interessantes do ponto de vista da resposta antioxidante (Llorach et al., 2008).

#### 5.3.2. Delineamento experimental

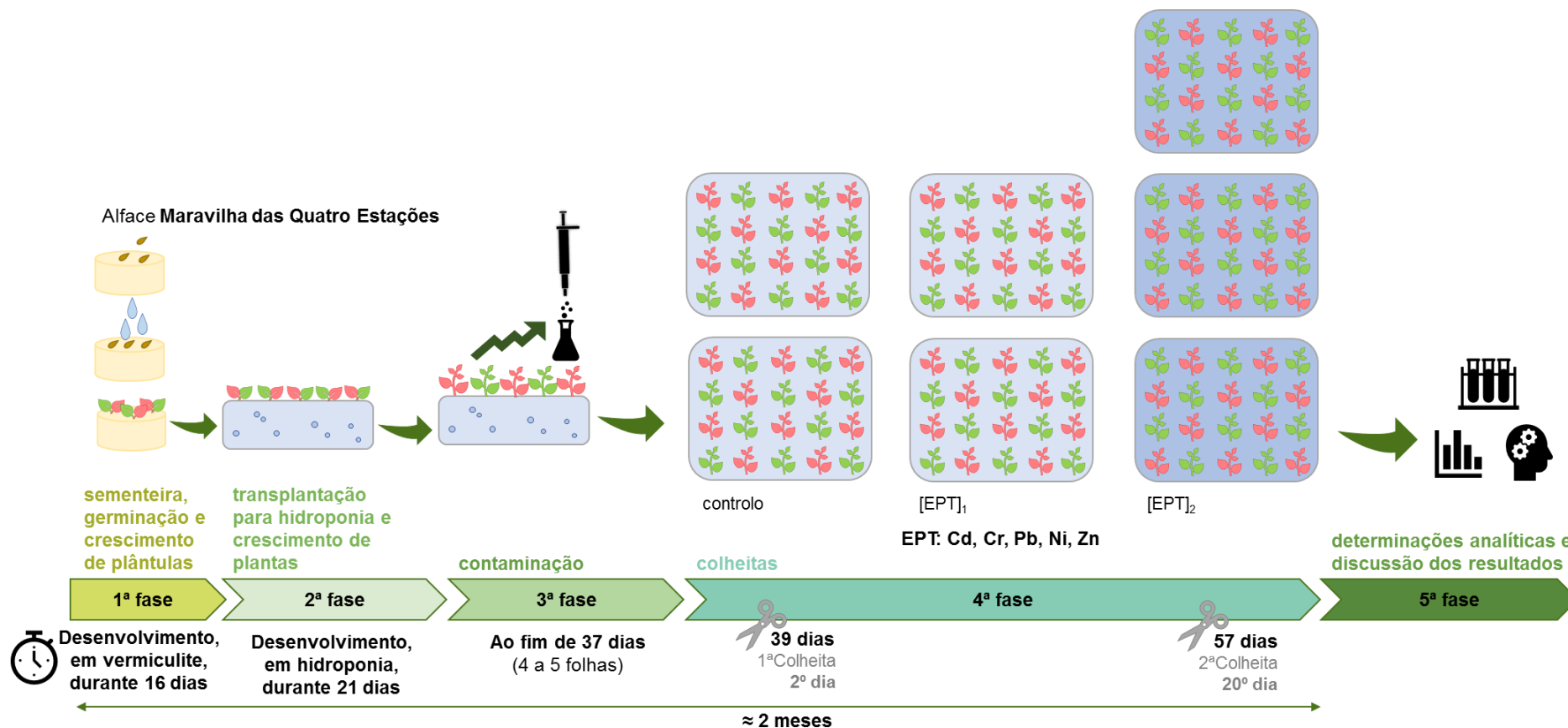
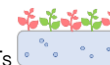
O delineamento experimental baseou-se no descrito por Martins et al. (2014), Moreira et al. (2015) e Pinto et al. (2017). Os ensaios de cultura sem solo<sup>3</sup> teve as mesmas fases de produção de plantas que o descrito para o **Capítulo IV**, sendo a 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> fase idênticas. Na 4<sup>a</sup> fase, foram apenas realizadas duas colheitas, ao fim de 39 e 57 dias de crescimento, correspondendo a 2 e 20 dias após a contaminação (**Figura 5.8**).

A escolha dos elementos químicos (Cd, Cr, Pb, Ni e Zn.) teve, como base, os resultados obtidos no **Capítulo IV**. As concentrações utilizadas estão descritas na **Tabela 5.1**.

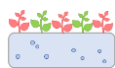
**Tabela 5.1** – Concentrações de EPT aplicadas, para cada modalidade, nos ensaios de avaliação da resposta antioxidante induzida pela acumulação de EPTs com cultura sem solo.

EPT	Controlo	[EPT] <sub>1</sub> (µM)	[EPT] <sub>2</sub>
não essenciais			
Cd	0	5	15
Cr	0	5	15
Pb	0	125	150
essenciais			
Ni	0	50	125
Zn	0	50	150

<sup>3</sup> Neste estudo, utilizaremos o termo hidroponia, como designação genérica para “cultura sem solo” ou “em solução nutritiva”.



**Figura 5.8** – Representação esquemática dos ensaios de avaliação da resposta antioxidante induzida pela acumulação de EPTs.



O critério utilizado para a seleção dos EPTs para este estudo baseou-se também no seu modo de ação no sistema biológico das plantas, ou seja, por apresentarem um comportamento redox (Cr) ou não-redox (Cd, Pb, Ni, Zn) nas células das plantas. Os EPTs não essenciais (Cd, Cr, Pb) foram aplicados em doses mais baixas que os EPTs essenciais (Ni, Zn).

Em ensaios anteriores (**Capítulo III e IV**) verificou-se que a alfaca se mostrou mais tolerante à presença de Zn, por isso optou-se por aplicar uma concentração ligeiramente superior. No caso dos EPTs não essenciais, a referência foram os ensaios no **Capítulo IV**, em que as concentrações escolhidas para o Cr induziram um efeito tóxico muito intenso pelo que, nestes ensaios, optou-se por aplicar concentrações mais baixas e semelhantes às aplicadas no caso do Cd. A contaminação dos meios foi realizada como descrito no **Capítulo IV**, com todas as alterações descritas e aplicadas para o Cr e Pb.

### 5.3.3. Instalação dos ensaios

Os ensaios para avaliação da resposta antioxidante decorreram entre 2015 e 2016 (**Tabela 5.2**).

**Tabela 5.2** – Cronograma utilizado para a realização dos ensaios de avaliação da resposta antioxidante induzida pela acumulação de EPTs.

Ano	Mês											
	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
2015									Cd			
										Ni		
										Zn		Pb
												Cr
2016	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
	Pb											
	Cr											
2017	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.

Legenda:

Cd

Zn

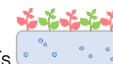
Ni

Determinações analíticas

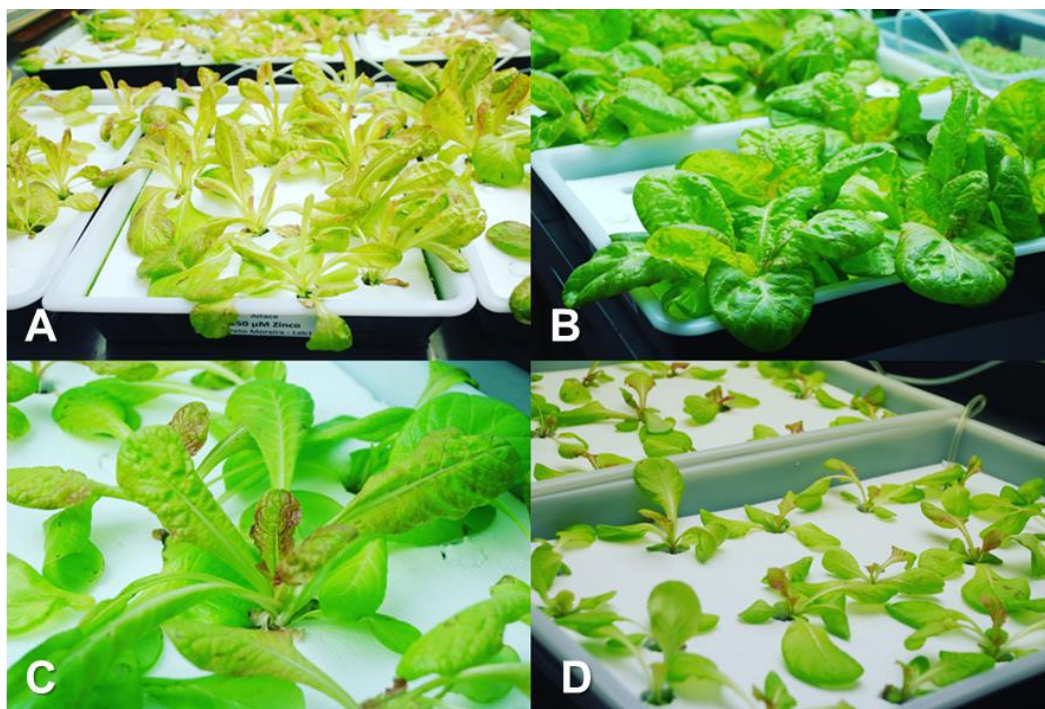
Pb

Cr

A metodologia aplicada foi idêntica à utilizada no **Capítulo IV**. As condições de crescimento e metodologia da produção inicial de plantas encontram-se descritas em **2.1.2** e **2.1.3**. Os



ensaios efetuaram-se numa sala de crescimento com temperatura, humidade e intensidade luminosa controladas, no Horto de Química Agrícola (**Figura 5.9**).

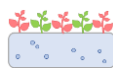


**Figura 5.9** – Figuras ilustrativas dos ensaios de avaliação da resposta antioxidante com alface avermelhada que foi instalado, na sala de crescimento, no Horto de Química Agrícola. A-plantas de alface M4E contaminadas (4<sup>a</sup> fase); B-plantas controlo de alface M4E (4<sup>a</sup> fase); C-plantas com o tamanho desejado para a contaminação (3<sup>a</sup> fase); D-desenvolvimento em hidroponia antes da contaminação (2<sup>a</sup> fase).

#### 5.3.4. Colheita, amostragem e conservação de amostras

Em cada colheita a amostragem foi efetuada de forma aleatória, para cada modalidade (amostra controlo e contaminadas), de forma a obter quantidades de material vegetal suficientes para se realizarem as determinações analíticas (mínimo 3 a 4 plantas).

As colheitas foram realizadas, ao fim de 2 e 20 dias, após a contaminação. Na colheita separaram-se as diferentes partes da planta: parte aérea (folhas novas e folhas velhas) e raiz. As amostras foram pesadas para obtenção da massa fresca (MF). Na preparação das amostras seguiu-se sempre a metodologia de retirar as últimas 4 a 5 folhas mais afastadas das folhas novas da planta, sendo consideradas como folhas velhas no presente trabalho. As folhas velhas foram separadas apenas para a planta adulta e foram contabilizadas as folhas que apresentavam sintomas visíveis de toxicidade.



Fez-se também um registo fotográfico das plantas obtidas para cada modalidade e tempo de exposição.

A metodologia utilizada para colheita e obtenção do material vegetal, seco e fresco está descrita em 2.2.1. Na conservação das amostras, parte do material vegetal foi seco (massa seca, MS), para se obter o conteúdo mineral. O material vegetal fresco foi congelado em azoto líquido e conservado, a -80 °C, para as determinações analíticas posteriores.

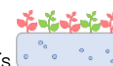
### 5.3.5. Determinações analíticas

As determinações analíticas (**Tabelas 5.3 e 5.4**) foram realizadas segundo as metodologias descritas em 2.3.1. para a determinação da concentração de elementos químicos e em 2.3.2. para todas as análises efetuadas por espectrofotometria de absorção molecular.

Na raiz (R2, R20) e folhas velhas (FV20) efetuaram-se menos determinações que nas folhas novas (F2, F20) e escolheram-se parâmetros que permitissem fazer uma caracterização geral da defesa antioxidante presente nesses tecidos.

**Tabela 5.3** – Determinações analíticas efetuadas, com material vegetal seco e fresco, para a planta jovem.

planta jovem	folhas F2	raiz R2
<b>material vegetal seco</b>	- concentração do EPT e elementos químicos: digestão ácida (2.3.1.1.); ICP-OES (2.3.1.3.).	
	- MS (2.2.1.) - MF (2.2.1.) - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2.3.2.1.) - MDA (2.3.2.2.) - CAT (2.3.2.9.3.) - SOD (2.3.2.9.2.) - GR (2.3.2.9.4.) - POD (2.3.2.9.5.)	
<b>material vegetal fresco</b>	- atividade antioxidante total (2.3.2.3.) - polifenóis totais (2.3.2.4.) - APX (2.3.2.9.6.) - GPX (2.3.2.9.7.) - PAL (2.3.2.9.8.) - ASC, ASA, DHA (2.3.2.7.) - TGSH, GSH, GSSG (2.3.2.8.) - clorofila a, b, total (2.3.2.5.) - antocianinas (2.3.2.6.)	



**Tabela 5.4** – Determinações analíticas efetuadas, com material vegetal seco e fresco, para a planta adulta.

planta adulta	folha nova F20	raiz R20	folha velha FV20
<b>material vegetal seco</b>	- concentração do EPT e elementos químicos: digestão ácida (2.3.1.1.); ICP-OES (2.3.1.3.).		
		- MS (2.2.1.) - MF (2.2.1.) - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2.3.2.1.) - MDA (2.3.2.2.) - CAT (2.3.2.9.3.) - SOD (2.3.2.9.2.) - GR (2.3.2.9.4.) - POD (2.3.2.9.5.)	
<b>material vegetal fresco</b>	- atividade antioxidante total (2.3.2.3.) - polifenóis totais (2.3.2.4.) - APX (2.3.2.9.6.) - GPX (2.3.2.9.7.) - PAL (2.3.2.9.8.) - ASC, ASA, DHA (2.3.2.7.) - TGSH, GSH, GSSG (2.3.2.8.) - clorofila a, b, total (2.3.2.5.) - antocianinas (2.3.2.6.)	- APX (2.3.2.9.6.) - ASA (2.3.2.7.)	- atividade antioxidante total (2.3.2.3.) - polifenóis totais (2.3.2.4.) - APX (2.3.2.9.6.) - ASA (2.3.2.7.)

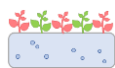
A concentração de elementos químicos foi determinada por ICP-OES e as condições experimentais utilizadas encontram-se descritas no **Anexo A** (na **Tabela A3**). Neste caso, para além dos EPTs adicionados como contaminantes, também foi feita a determinação do teor de Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu e Mn.

Os cálculos relativos à humidade, à proporção de EPT nas folhas e à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz de plantas contaminadas encontram-se descritos em **4.3.5.3. (Capítulo IV)**.

### 5.3.6 Tratamento estatístico

Aos resultados foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) a um fator (SPSS 13.0, *SPSS Inc.*) que permitiu avaliar o efeito do fator concentração de EPT aplicado, ao longo do tempo,





nas determinações analíticas descritas em 5.3.5. Para se determinar se existiram diferenças significativas entre as médias, das amostras controle e contaminadas, utilizou-se o teste Tukey, com um nível de confiança de 95 %.

As letras minúsculas nos gráficos refletem se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas), ou seja, por exemplo, se ao fim de 20 dias existem diferenças significativas de dada variável, em relação ao controle ou às plantas expostas a dado EPT. As letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre F20 e FV20 na planta adulta. Nas Tabelas, os asteriscos refletem diferenças significativas dentro da mesma modalidade, ou seja, se para a amostra controle existem diferenças entre os 2 ou 20 dias de exposição ao EPT.

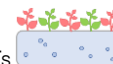
A análise de partição por *clusters* (Partition Cluster Analysis, PAM) foi realizada usando o programa R 1.0.136 (RStudio, Inc.). A PAM foi realizada definindo-se, à priori, a formação de *clusters*, permitindo distribuir por classes e diferenciar os indivíduos contaminados com cada EPT. Este tratamento estatístico foi efetuado para os indivíduos expostos a Cd (15  $\mu\text{M}$ ), Cr (15  $\mu\text{M}$ ), Pb (150  $\mu\text{M}$ ), Ni (125  $\mu\text{M}$ ) e Zn (150  $\mu\text{M}$ ), das plantas jovens e adultas, ao fim de 2 ou 20 dias de tratamento, respectivamente. A análise classificatória foi realizada em folhas e raiz.

Em folhas novas (F2, F20), utilizou-se uma matriz de correlação dos dados com 13 variáveis normalizadas:  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), MDA ( $\mu\text{M g}^{-1}$ ), teor de compostos fenólicos ( $\text{mg g}^{-1}$ ), antocianinas ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ), atividades enzimáticas da SOD, CAT, POD, APX, GPX, GR, PAL ( $\text{U g}^{-1}$ ) e metabolitos antioxidantes não-enzimáticos (ASA, GSH,  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ).

Em raiz (R2), a análise classificatória foi efetuada com 6 variáveis normalizadas:  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), MDA ( $\mu\text{M g}^{-1}$ ) e atividades enzimáticas da SOD, CAT, POD e GR ( $\text{U g}^{-1}$ ). Na raiz da planta adulta (R20), utilizaram-se 8 variáveis normalizadas:  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), MDA ( $\mu\text{M g}^{-1}$ ), atividades enzimáticas da SOD, CAT, POD, APX, GR ( $\text{U g}^{-1}$ ) e ASA ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ).

#### 5.4. Resultados e Discussão

Para a avaliação da resposta antioxidante induzida por EPTs vai ser efetuada uma caracterização da acumulação dos elementos químicos e discutida a sua correlação com os parâmetros indicadores de stresse oxidativo ( $\text{H}_2\text{O}_2$  e MDA), os parâmetros indicadores da intensidade do stresse (pigmentos, atividade antioxidante, compostos fenólicos, PAL), e os mecanismos de defesa antioxidante enzimática (SOD, CAT, POD, GR, APX, GPX) e não-



enzimática (ASA, ASC, DHA, TGS, GSSG, GSH). Como foi referido em **5.2.**, neste capítulo foi utilizada apenas a alface M4E e realizaram-se colheitas ao fim de 2 e 20 dias, após a contaminação, pelo que os materiais vegetais estudados foram:

- folha nova (F2) e raiz (R2), em plantas com 39 dias de crescimento (planta jovem), expostas a 2 dias de contaminação, para cada uma das concentrações testadas;
- folha nova (F20), raiz (R20) e folha velha (FV20), em plantas com 57 dias de crescimento (planta adulta), expostas a 20 dias de contaminação, para cada uma das concentrações testadas.

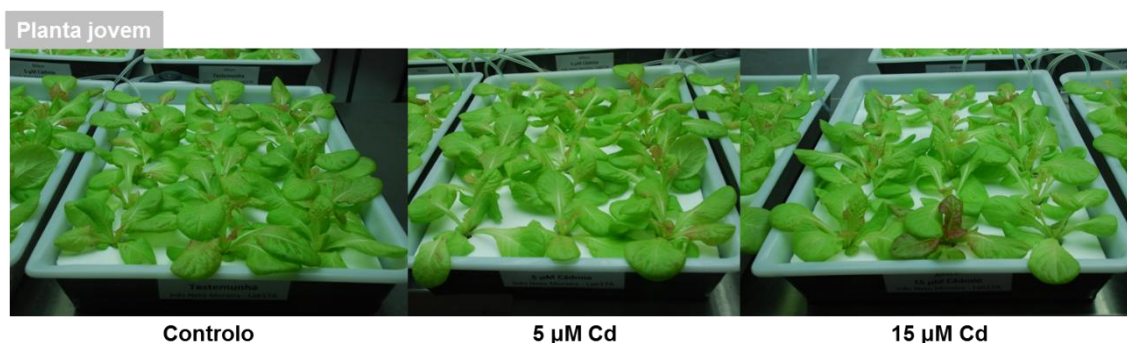
Com os resultados obtidos neste Capítulo vai ser possível desenhar um esquema da resposta integrada da planta face à toxicidade induzida por cada EPT que permitirá à planta um eficaz sistema de defesa antioxidante.

#### 5.4.1. Cádmio

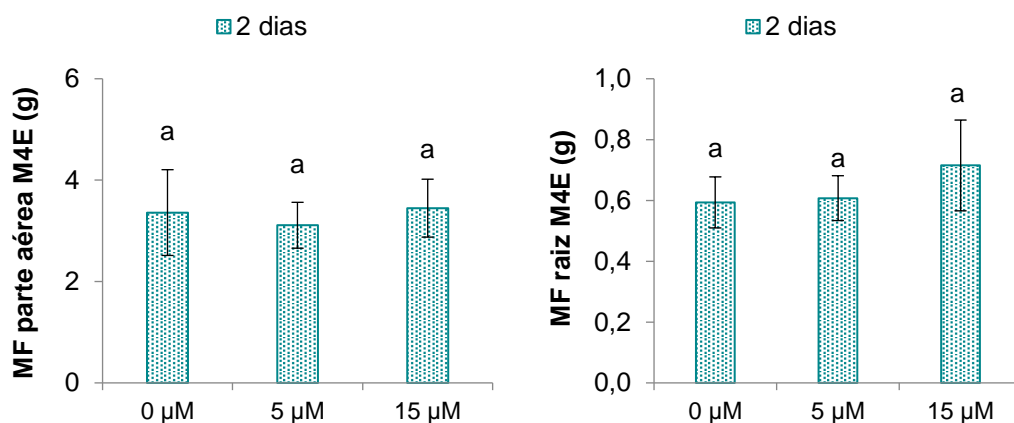
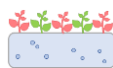
##### 5.4.1.1. Planta jovem

##### 5.4.1.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Cd

As fotografias obtidas para as plantas jovens controlo e contaminadas com 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cd, encontram-se representadas na **Figura 5.10**. Na **Figura 5.11** encontram-se os resultados obtidos para a massa fresca, da parte aérea e da raiz, da planta jovem.



**Figura 5.10** – Registo fotográfico da planta jovem de alface M4E ao 2º dia de exposição com Cd.



**Figura 5.11** – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas jovens de alface M4E ao fim de 2 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 5 e 15 µM de Cd.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).

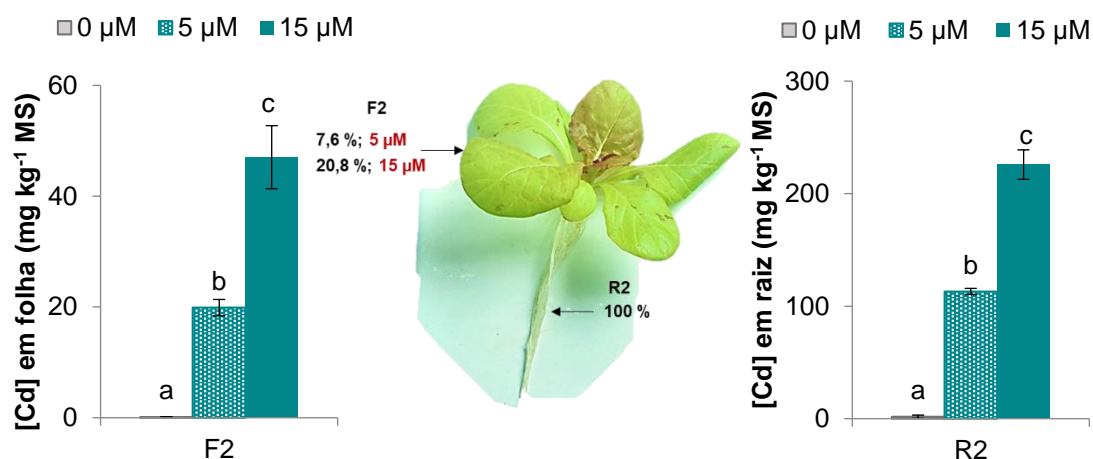
Na planta jovem não se verificam sintomas visíveis de toxicidade em nenhuma modalidade, tanto na parte aérea como na raiz, indicando que este nível de contaminação (5, 15 µM) durante este período de tempo (2 dias de contaminação) não permite que se observem visualmente efeitos tóxicos nas plantas jovens de alface.

O crescimento da planta aparentemente também não é afetado, uma vez que não se observam de diferenças significativas na massa fresca, da parte aérea e da raiz, de plantas contaminadas com cádmio em relação às plantas controle.

No presente trabalho calculou-se os valores médios das percentagens de humidade para a biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controle, considerando-se a exposição ao fim de 2 dias com 5 e 15 µM de Cd. Verifica-se que existe uma ligeira diminuição no teor de água das plantas controle (parte aérea: 90,6 %; raiz: 91,7 %) em relação às plantas contaminadas com 5 µM (parte aérea: 90,8 %; raiz: 89,0 %) e 15 µM (parte aérea: 87,0 %; raiz: 84,5 %). Esta diminuição, aparentemente, não parece muito significativa e, provavelmente, o Cd também estará a interferir com outros elementos que são essenciais para o normal desenvolvimento da planta.

#### 5.4.1.1.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos

Na **Figura 5.12** apresentam-se os resultados obtidos para as concentrações de Cd acumuladas, em folha e raiz, na planta jovem contaminada com 5 e 15 µM.



**Figura 5.12** – Concentração de Cd em folha e raiz de plantas jovens de M4E ao fim de 2 dias de exposição a 5 e 15 µM de Cd.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ). As percentagens indicadas na figura central correspondem à proporção de Cd nas folhas em relação à quantidade na raiz (considerada como 100 %).

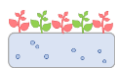
É possível verificar que à medida que se aumenta a concentração de Cd na solução nutritiva, a planta jovem acumula uma maior quantidade deste elemento nos seus órgãos.

A acumulação de Cd ocorre maioritariamente na raiz da planta jovem, comparativamente à parte aérea. Ao fim de 2 dias de exposição as raízes acumulam  $113,09 \pm 2,69$  mg de Cd kg<sup>-1</sup> MS (5 µM) e  $225,79 \pm 13,09$  mg de Cd kg<sup>-1</sup> MS (15 µM). As folhas acumulam  $19,88 \pm 1,48$  mg de Cd kg<sup>-1</sup> MS (5 µM) e  $47,04 \pm 5,69$  mg de Cd kg<sup>-1</sup> MS (15 µM).

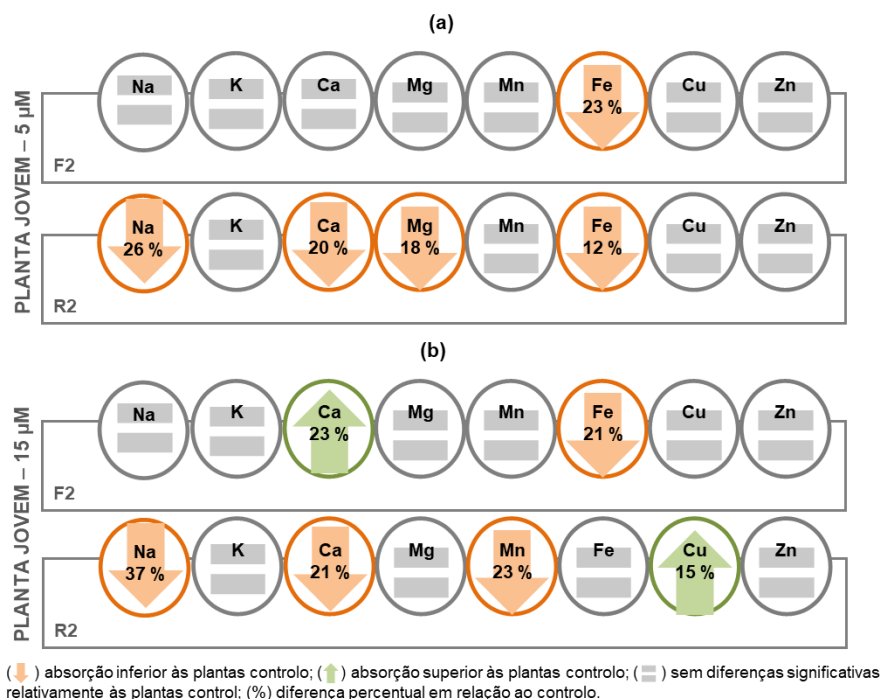
A explicação para este aumento do teor de Cd nas raízes já foi referida no **Capítulo IV**. Apesar de se não verificarem efeitos visíveis de toxicidade na parte aérea e raiz (**Figura 5.10**), a planta jovem de alface parece tolerar níveis relativamente elevados de Cd nos seus órgãos.

Na **Figura 5.12** também estão representadas as percentagens de Cd acumulado na parte aérea em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas jovens contaminadas com 5 e 15 µM de Cd.

É possível verificar que são translocados cerca de 7,6 % (5 µM) e 20,8 % (15 µM) para a parte aérea da planta jovem. Com a exposição a Cd durante 2 dias há um aumento das percentagens acumuladas de Cd entre as plantas de alface contaminadas com 5 e 15 µM de Cd, tal como verificado no **Capítulo IV**. Apesar de o Cd ser considerado um elemento não essencial, verifica-se que uma quantidade considerável de Cd absorvido é translocado para a parte aérea.



Na **Figura 5.13** apresentam-se as principais tendências observadas na variação dos teores dos elementos químicos devido à presença de Cd em solução nutritiva, para a folha e raiz da planta jovem (os respectivos valores encontram-se na **Tabela B1**, do **Anexo B**).



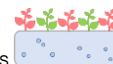
**Figura 5.13** – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F2 e R2 ao fim de 2 dias de exposição a 5 (a) e 15 µM (b) de Cd.

A exposição a 5 µM de Cd afeta negativamente a concentração de Fe ocorrendo uma diminuição significativa, comparativamente ao controle, em F2 e R2. Na R2 existe também uma diminuição dos teores de Na, Ca e Mg.

A concentração de 15 µM de Cd, em F2, demonstra continuar a afetar a concentração de Fe, ocorrendo uma diminuição significativa do seu teor. Por outro lado, existe um estímulo da absorção de Ca havendo um aumento significativo da sua presença em folhas. Na R2, há um aumento significativo da acumulação de Cu, que é acompanhado por uma diminuição significativa de Na, Ca e Mn.

O Cd é absorvido pelos mesmo transportadores que o Ca, Mg e Fe (Gallego et al., 2012), daí as alterações observadas no presente estudo. Wu et al. (2016) referiram que a absorção de Cd pode ser inibida pela presença de Mn, sendo estes elementos antagonistas.

Os níveis de Ca afetam a absorção de Cd porque este compete com o Ca pelos seus canais (Wojas et al., 2007). A diminuição no teor de Ca poderá também estar relacionada com a



ligeira diminuição no teor de água, uma vez que é fundamental na razão K/Ca e pode ter impacto no balanço hídrico.

Estes resultados evidenciam que a contaminação com Cd durante 2 dias já interfere com a absorção de nutrientes que são essenciais para o crescimento normal da planta, principalmente na raiz.

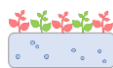
#### 5.4.1.1.3. Caracterização da resposta da planta jovem

Na **Tabela 5.5** estão os resultados obtidos para os parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Cd.

##### *Folhas novas - 5 $\mu$ M Cd (planta jovem)*

Relativamente à caracterização da resposta da planta jovem, nas folhas novas, expostas a 5  $\mu$ M de Cd, não se observaram diferenças significativas, entre as plantas controlo e contaminadas, nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo ( $H_2O_2$ ) e danos nas membranas (MDA), parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (clorofilas, antocianinas, compostos fenólicos e PAL), na atividade antioxidante total, na atividade das enzimas antioxidantes, nos teores de GSH, GSSG e TGSH.

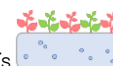
O stresse induzido por esta concentração, durante este tempo de exposição, não foi suficiente para induzir uma resposta mais intensa na planta jovem. A única resposta antioxidante observada foi um aumento significativo no teor de ASA. Este aumento pode indicar um papel mais relevante deste metabolito nesta fase inicial de desenvolvimento da planta. O aumento da síntese deste composto pode estar relacionado com a manutenção dos níveis de  $H_2O_2$ , estando o ascorbato a atuar como antioxidante, eliminando as ROS produzidas em excesso devido ao stresse induzido por 5  $\mu$ M de Cd.

**Tabela 5.5** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Cd.

		F2		
	Unidade	0 µM	5 µM Cd	15 µM Cd
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	305,4±65,3a	304,8±26,3a	442,4±21,6b
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,14±0,02a	0,16±0,03a	0,18±0,01a
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse				
clorofila a	µmol g <sup>-1</sup>	0,51±0,02a	0,48±0,06a	0,37±0,03b
clorofila b	µmol g <sup>-1</sup>	0,13±0,01a	0,12±0,01a	0,09±0,01b
clorofila total	µmol g <sup>-1</sup>	0,64±0,03a	0,60±0,07a	0,46±0,04b
antocianinas	µmol g <sup>-1</sup>	0,05±0,01a	0,05±0,01a	0,05±0,002a
compostos fenólicos	mg g <sup>-1</sup>	0,06±0,01a	0,07±0,03a	0,16±0,04b
PAL	U g <sup>-1</sup>	0,23±0,05a	0,22±0,03a	0,34±0,01b
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	71,0±9,0a	90,3±20,3a	151,7±27,3b
% RSA	%	20,4±0,96a	24,7±2,8a	35,5±5,5b
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	107,2±15,0a	109,6±7,8a	100,8±8,3a
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,04±0,01a	0,07±0,02a	0,05±0,01a
POD	U g <sup>-1</sup>	0,15±0,01a	0,18±0,06a	0,18±0,10a
APX	U g <sup>-1</sup>	1,90±0,56a	1,71±0,23a	2,45±0,45a
GPX	U g <sup>-1</sup>	63,6±2,9a	63,4±3,9a	66,9±1,0a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,08±0,01a	0,08±0,01a	0,09±0,02a
Metabolitos antioxidantes				
ASA	µmol g <sup>-1</sup>	0,92±0,11a	1,81±0,09b	1,31±0,18c
DHA	µmol g <sup>-1</sup>	0,37±0,03a	0,27±0,05a	0,74±0,06b
ASC	µmol g <sup>-1</sup>	1,29±0,22ab	2,08±0,07a	2,05±0,15b
GSH	µmol g <sup>-1</sup>	1,17±0,16a	0,91±0,16a	1,10±0,28a
GSSG	µmol g <sup>-1</sup>	0,09±0,01a	0,11±0,02a	0,28±0,05a
TGSH	µmol g <sup>-1</sup>	1,26±0,16a	1,02±0,17a	1,38±0,43a

Os resultados são apresentados na forma média±desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.





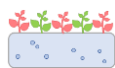
Esta exposição a concentrações excessivas de Cd durante pequenos períodos de tempo que origina a síntese de ASA também foi observada por vários autores em folhas de *Arabidopsis thaliana* exposta a 0, 5, 10  $\mu\text{M}$  de Cd, durante 24 h (Keunen et al., 2013), em *Phaseolus vulgaris* contaminada com 2  $\mu\text{M}$  de Cd ao fim de 24, 48 e 72 h (Smeets et al., 2005) e em *Pinus sylvestris* 0, 5, 50  $\mu\text{M}$ , após 6, 12, 24, 48, 96 h, em que existiu um aumento transitório dos teores de ASA (Schutzendubel et al., 2001).

#### *Folhas novas - 15 $\mu\text{M}$ Cd (planta jovem)*

Na folha, exposta a 15  $\mu\text{M}$ , observa-se um aumento significativo nos teores de peróxido de hidrogénio. Uma explicação para este aumento deve-se ao facto de apenas a concentração mais elevada ser suficiente, após 2 dias de contaminação, para ultrapassar os mecanismos de defesa ou para desencadear a produção em excesso desta espécie. No entanto, não são observadas diferenças significativas nos teores de MDA. Estes resultados evidenciam um baixo grau de stresse oxidativo nas plantas jovens de alface. No entanto, o facto de a presença de Cd não ter aumentado o teor de MDA, indica que não estão a existir danos oxidativos nas membranas podendo estar a atuar um eficiente sistema antioxidante enzimático ou não-enzimático que evita a peroxidação lipídica.

O teor de clorofila (a, b e total) diminui significativamente para 15  $\mu\text{M}$  Cd, apesar de visualmente não se observar este efeito (**Figura 5.10**). Não foram observadas diferenças significativas no teor de antocianinas, em relação à amostra controlo, evidenciando que não está a ocorrer a sua produção nesta fase inicial de desenvolvimento. Vários autores referiram que para a maioria das espécies é necessária uma elevada concentração de Cd para que sejam detetados efeitos no sistema fotossintético (Ekmecki et al., 2008; Martins et al., 2013; Redondo-Gómez et al., 2010; Roychoudhury et al., 2012), o que está de acordo com os resultados aqui obtidos para a planta jovem.

A capacidade antioxidante aumenta significativamente para as folhas expostas a 15  $\mu\text{M}$ , indicando que o sistema antioxidante da planta está ativo. A atividade da PAL, aumenta significativamente para 15  $\mu\text{M}$  de Cd, o que indica que as reações precursoras da produção de compostos fenólicos estão ativas. Nesta resposta metabólica, a planta desencadeia uma rápida produção das ROS (*oxidative burst*), seguida pela ativação de reações do metabolismo secundário (Schützendübel et al. (2001). O metabolismo de vários fenóis é alterado durante o stresse induzido por metais pesados, sendo regulado conforme a concentração de metal presente (Mourato et al., 2012). Os compostos fenólicos podem atuar como quelantes de



metais e/ou podem eliminar as ROS (Michalak, 2006), tendo um papel importante no combate ao stresse oxidativo.

No entanto, a exposição a esta concentração de Cd não é suficiente para induzir uma resposta enzimática. Relativamente aos metabolitos antioxidantes não-enzimáticos, há um aumento significativo no teor de ASA. Tal como justificado para a menor concentração de Cd testada, este aumento da concentração de ASA pode indicar um papel crucial deste metabolito nesta fase inicial de desenvolvimento. Para 15  $\mu\text{M}$  de Cd também não se observam diferenças significativas no teor de GSH, indicando que a glutathione não apresenta um papel fundamental como antioxidante para estas condições testadas.

Na **Tabela 5.6** estão os resultados obtidos para os parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Cd.

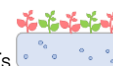
**Tabela 5.6** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Cd.

		R2		
	Unidade	0 µM	5 µM Cd	15 µM Cd
Parâmetros de crescimento				
Massa fresca da raiz	g	0,6±0,1a	0,6±0,1a	0,7±0,2a
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	30,5±2,6a	50,6±11,9b	30,6±6,7a
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,14±0,03a	0,14±0,01a	0,14±0,01a
Defesa Antioxidante				
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	123,5±17,8a	93,5±0,7a	105,0±10,9a
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,0275±0,005a	0,0278±0,005a	0,0334±0,004a
POD	U g <sup>-1</sup>	1,51±0,09a	1,56±0,07a	1,61±0,48a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,036±0,003a	0,044±0,004a	0,042±0,003a

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controlo.

#### *Raiz – 5 e 15 $\mu\text{M}$ Cd (planta jovem)*

Na raiz não se observam diferenças significativas nos teores de MDA, demonstrando que não existem danos oxidativos na raiz jovem, nem na atividade de nenhuma enzima antioxidante (SOD, CAT, POD e GR), evidenciando que a raiz não é muito afetada pelo stresse induzido nesta fase inicial, apesar de ser neste órgão que se acumula preferencialmente o Cd (**Figura**

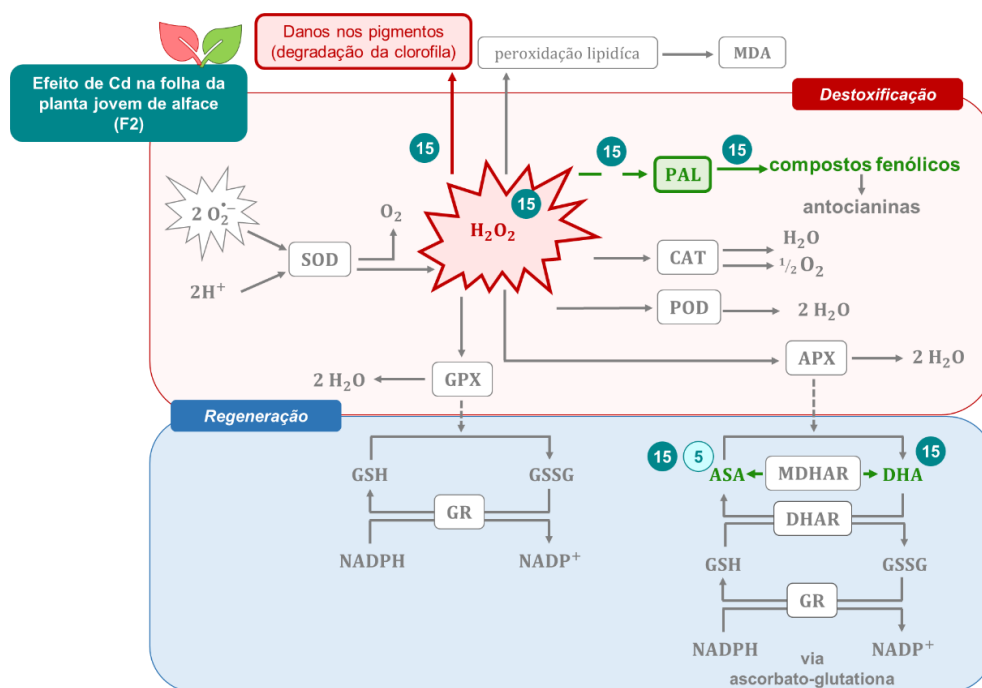


**5.12).** Provavelmente, neste caso, o Cd fica retido na raiz, por ligação às paredes celulares ou a quelatos, sendo posteriormente armazenado em vacúolos (Martins et al., 2013) e deste modo, não se verifica nenhum efeito adverso na raiz jovem.

A única exceção verificada é com a exposição a 5  $\mu\text{M}$  onde há um aumento significativo do teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  indicando um estímulo na produção desta espécie na raiz ao contrário do que aconteceu nas folhas. No entanto, não se observam diferenças significativas nos teores de MDA, indicando que não existem indícios de danos oxidativos. Com a exposição a 15  $\mu\text{M}$ , não se observaram diferenças significativas nos teores de peróxido de hidrogénio.

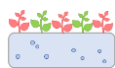
#### 5.4.1.1.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta jovem face à toxicidade induzida por Cd

O esquema metabólico de resposta antioxidante da planta jovem, em folhas, após 2 dias de exposição a cádmio encontra-se na **Figura 5.14**.



**Figura 5.14** – Representação esquemática da resposta antioxidante em F2 de alface M4E contaminada com 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cd (indicado na figura como 5 e 15).

A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais.



Apesar de visualmente não se verificarem sintomas visíveis de toxicidade, o Cd induziu uma resposta na planta jovem de alface, sendo possível com os resultados obtidos em folhas realizar o presente esquema metabólico. Em folhas, com a exposição a 5  $\mu\text{M}$  de Cd, apenas se verifica um aumento do teor de ASA, que é, provavelmente, responsável por manter baixos os níveis de peróxido.

Nesta fase inicial de crescimento, apenas a concentração mais elevada de Cd permite desencadear uma ligeira resposta da planta face ao stresse induzido por este elemento. Com a exposição a 15  $\mu\text{M}$  de Cd, há a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que, aparentemente, está a ser removido através da capacidade antioxidante do ASA, que é fundamental na resposta da planta. Há também um aumento da atividade da PAL que induz a produção de compostos fenólicos, que são fundamentais na eliminação das ROS. Para além disso, apesar de não ser detetado visualmente, existem danos nos pigmentos, que resultam, possivelmente, do desequilíbrio existente na absorção de nutrientes e/ou de danos diretos que o stresse oxidativo provoca na degradação da clorofila.

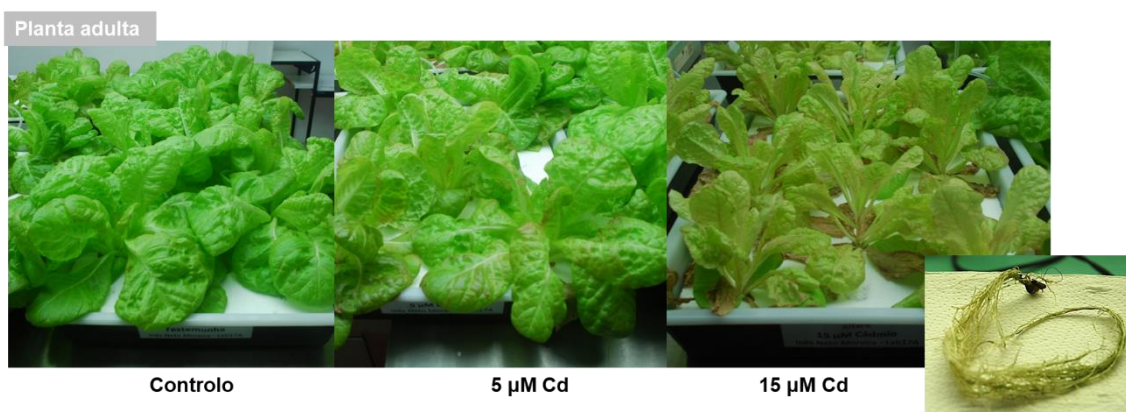
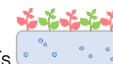
Na raiz não se observa uma resposta nem efeitos adversos, apesar de ser neste órgão onde se acumulam as maiores concentrações de Cd. Isto acontece muito, provavelmente, porque o Cd fica retido na raiz quelatado e/ou armazenado em vacúolos. Este comportamento evidencia uma maior sensibilidade da folha face ao stresse induzido por Cd nesta fase inicial de desenvolvimento da planta. Por este motivo não se apresenta um esquema para estas condições de stresse.

#### **5.4.2.1. Planta adulta**

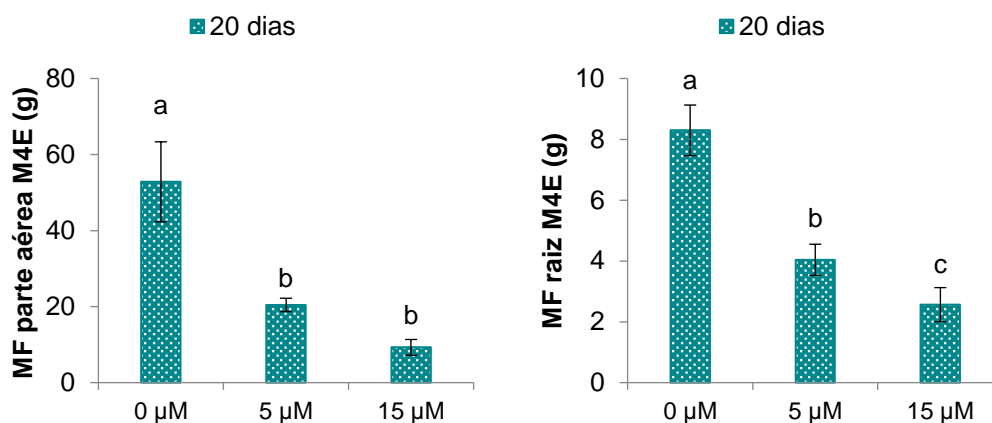
##### **5.4.2.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Cd**

As fotografias obtidas para as plantas adultas controlo e contaminadas com Cd, encontram-se representadas na **Figura 5.15**. Na **Figura 5.16** apresentam-se os resultados obtidos para a massa fresca, da parte aérea e da raiz, da planta adulta.

Na planta adulta exposta a 5  $\mu\text{M}$  apenas se verifica uma diminuição no tamanho das plantas, havendo uma inibição do crescimento da parte aérea e da raiz.



**Figura 5.15** – Registo fotográfico da planta adulta de alface M4E ao 20º dia de exposição com Cd.

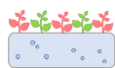


**Figura 5.16** – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas adultas de alface M4E ao fim de 20 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 5 e 15 µM de Cd.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controlo ( $n=3$ ).

Na planta adulta contaminada com 15 µM já se verificam sintomas visíveis de toxicidade mais intensos, nomeadamente, o aparecimento de folhas novas cloróticas e com cor ligeiramente avermelhada, uma diminuição do tamanho da folha, folhas velhas acastanhadas, e uma raiz com crescimento atrofiado e com pontos negros nas extremidades. A inibição do crescimento e estes sintomas visíveis de toxicidade induzidos pela presença de cádmio já foram referidos e abordados no **Capítulo IV**.

Neste tempo de exposição, o crescimento da planta é afetado. Na planta adulta, existe uma diminuição bastante significativa da massa fresca da parte aérea e da raiz, comparativamente às plantas controlo, sendo essa diminuição mais acentuada com 15 µM de Cd.



Através da observação dos gráficos é possível verificar que, provavelmente, é a parte aérea que é mais afetada em termos de biomassa para as duas contaminações aplicadas. Se se calcular os valores relativos à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controlo, é possível confirmar este efeito. No caso da contaminação com 5  $\mu\text{M}$  existe uma diminuição de 61,3 % na parte aérea, e de 51,3 % na raiz. Com a exposição a 15  $\mu\text{M}$ , verifica-se uma diminuição superior de 82,4 % e de 69,1 %, para a parte aérea e raiz, respetivamente.

No presente trabalho calculou-se os valores médios das percentagens de humidade para a biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controlo, considerando-se a exposição ao fim de 20 dias com 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cd. Verifica-se que existe uma ligeira diminuição no teor de água das plantas controlo (parte aérea: 90,4 %; raiz: 92,6 %) em relação às plantas contaminadas com 5  $\mu\text{M}$  (parte aérea: 88,4 %; raiz: 90,1 %) e 15  $\mu\text{M}$  (parte aérea: 82,1 %; raiz: 89,3 %). Esta diminuição, aparentemente, não parece muito significativa e provavelmente o Cd estará também a interferir com outros elementos que são essenciais para o normal desenvolvimento da planta.

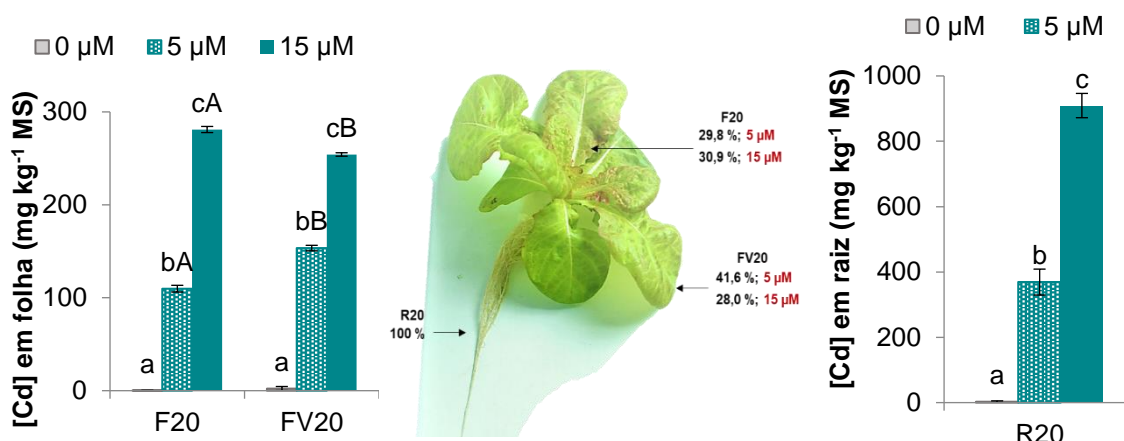
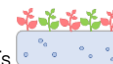
#### 5.4.2.1.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos

Na **Figura 5.17** apresentam-se os resultados obtidos para a acumulação de Cd, na folha e na raiz, da planta adulta.

Quanto maior a quantidade de Cd aplicada no meio exterior, maior a quantidade acumulada nos diferentes órgãos da planta. A existência de efeitos visíveis de toxicidade na parte aérea, tal como se observa na **Figura 5.15**, poderá estar diretamente relacionada com este nível de acumulação de Cd na planta adulta.

Na planta adulta também se verifica uma concentração de Cd na raiz muito superior à obtida nas folhas, sendo essa acumulação ainda maior na raiz exposta a 15  $\mu\text{M}$  de Cd. A explicação para este aumento do teor de Cd nas raízes já foi descrita no **Capítulo IV**.

Na R20, a exposição a 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cd resulta numa acumulação bastante elevada de 369,08 $\pm$ 39,66 e 909,37 $\pm$ 37,20 mg de Cd kg<sup>-1</sup> MS, respetivamente. A F20 acumula 109,81 $\pm$ 3,60 e 281,06 $\pm$ 3,31 mg de Cd kg<sup>-1</sup> MS, quando exposta a 5 e 15  $\mu\text{M}$ , respetivamente. Ao contrário do que seria de esperar, a quantidade acumulada de Cd na FV20 é muito semelhante à obtida para a F20, 153,44 $\pm$ 2,98 (5  $\mu\text{M}$ ) e 254,18 $\pm$ 1,84 mg de Cd kg<sup>-1</sup> MS (15  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 5.17** – Concentração de Cd em folha e raiz de plantas adultas de M4E ao fim de 20 dias de exposição a 5 e 15 µM de Cd.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ). As letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre F20 e FV20. Os valores indicados correspondem às percentagens de Cd nas folhas em relação à quantidade na raiz (considerada como 100 %).

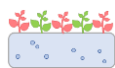
Na **Figura 5.17** apresentam-se as percentagens de Cd acumulado em plantas adultas na parte aérea em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %). Estes resultados indicam que efetivamente existe translocação de Cd para a parte aérea da planta adulta.

Em F20 não existem grandes variações nas percentagens acumuladas de Cd quando expostas a 5 µM (29,8 %) ou 15 µM (30,9 %), evidenciando que ao fim deste período de exposição já existe um equilíbrio entre o interior da planta e o Cd presente no meio. As diferenças percentuais obtidas também indicam que existe um mecanismo mais eficiente, havendo uma translocação menor de Cd na F20 (29,8 %) do que na FV20 (41,6 %), exposta a 5 µM de Cd, ao contrário do que se observa com a contaminação de 15 µM (28,0 %, FV20).

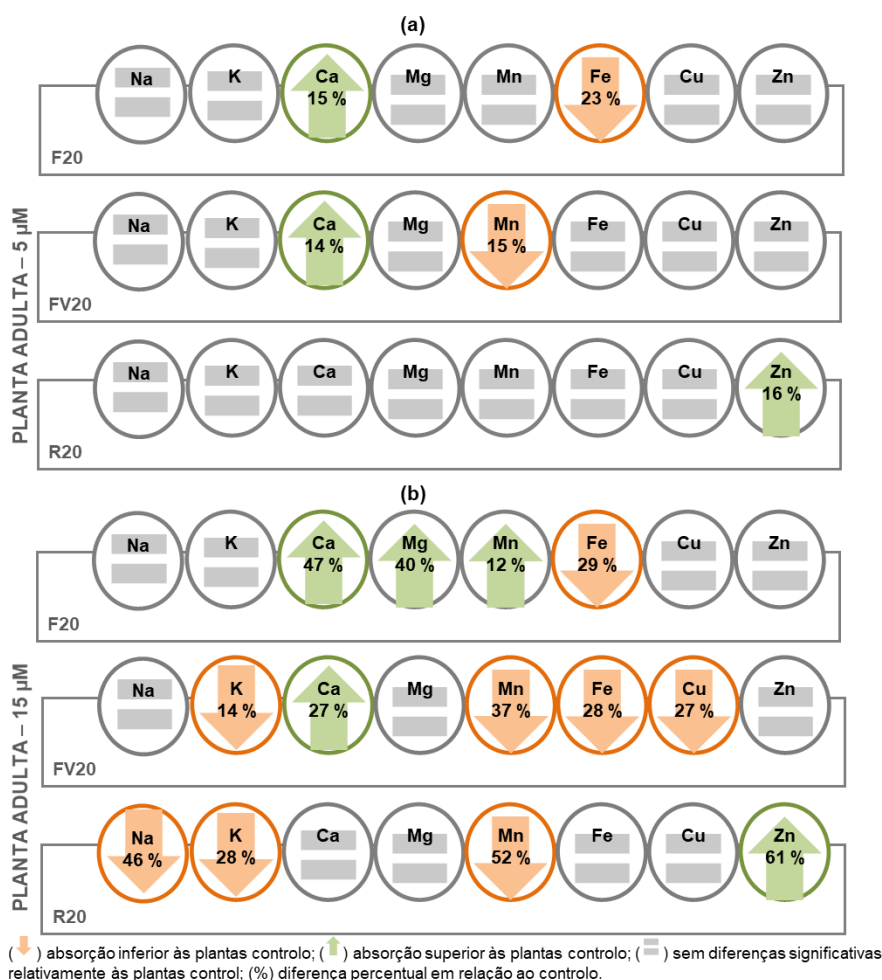
Na **Figura 5.18** apresentam-se as principais tendências observadas na variação dos teores dos elementos químicos devido à presença de Cd em solução nutritiva, para a folha e raiz da planta adulta, respetivamente (os respetivos valores encontram-se na **Tabela B2** do **Anexo B**).

A absorção de outros elementos químicos pode ser afetada pela presença de Cd, o que pode ser explicado pelo ligeiro desequilíbrio osmótico que desencadeia ou pela competição entre elementos quimicamente semelhantes. É possível verificar que quanto maior a concentração de Cd aplicada mais afetadas são as quantidades acumuladas dos diversos nutrientes.



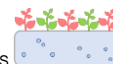


Na planta adulta exposta a 5  $\mu\text{M}$  de Cd, nas folhas novas há um aumento significativo dos teores de Ca, acompanhado por um decréscimo nos teores de Fe. Nas folhas velhas continua a existir um aumento significativo nos teores de Ca e um decréscimo significativo nos teores de Mn. Na R20 apenas aumenta significativamente os teores de Zn.



**Figura 5.18** – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F20, R20 e FV20 ao fim de 20 dias de exposição a 5 (a) e 15  $\mu\text{M}$  (b) de Cd.

Com a contaminação com 15  $\mu\text{M}$  de Cd já se verifica uma variação dos teores de mais elementos químicos. Na F20 ocorre um aumento significativo dos teores de Ca, Mg e Mn estando estes elementos a ser translocados para a parte aérea que continua a ser acompanhado por uma diminuição significativa de Fe. Nas FV20, o que se observa é apenas um aumento da acumulação de Ca e um decréscimo significativo da acumulação de K, Mn, Fe e Cu. Na R20, o Cd parece afetar significativamente a absorção de Na, K e Mn. Por outro lado, há um estímulo da absorção de Zn, tal como acontece nas plantas expostas a 5  $\mu\text{M}$ .



Há dois efeitos que devem ser referidos: (i) a maior ou menor absorção do elemento químico pelas raízes e (ii) a sua posterior translocação para a parte aérea. Se não existem diferenças na absorção pela raiz, mas verifica-se esse efeito na parte aérea significa que a absorção pela raiz não é afetada, mas a translocação é. Este efeito observa-se, por exemplo, no caso da contaminação com 15  $\mu\text{M}$  de Cd onde existe uma diminuição no teor de Fe (F20, FV20) e de Cu (FV20), apesar de não existirem diferenças na absorção pela raiz. O mesmo se verifica com a exposição a 5  $\mu\text{M}$  de Cd para o Fe (F20) e Mn (FV20).

Neste sentido, o Cd demonstra aumentar os teores de Ca e Zn. De facto, o Cd pode efetivamente afetar a concentração de Ca nos tecidos, de modo diferente consoante o estado de desenvolvimento da planta (Mourato et al., 2015), tal como se verifica neste trabalho. Alguns autores têm descrito a influência negativa de Cd na acumulação de Ca (de la Rosa et al., 2004), enquanto outros têm verificado um aumento da concentração deste elemento em plantas contaminadas com Cd (de la Rosa et al., 2005), podendo este comportamento estar relacionado com a idade da planta quando o stresse é aplicado e a competição de Ca e Cd pelos mesmos transportadores.

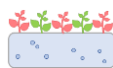
O aumento observado nos teores de Zn pode ser resultado do facto de a translocação do Cd ser mediada pelos mesmos transportadores do Zn (Gallego et al., 2012), o que pode justificar o aumento da absorção radicular de Zn e o facto de haver Cd presente na parte aérea da planta.

A acumulação de Cd pode originar a inibição do crescimento da raiz e, por isso, diminuir a absorção de vários nutrientes. A presença de Cd provoca uma diminuição maior nos teores de K, Na, Mn e Fe. A diminuição nos níveis de potássio resulta em alterações na razão K/Ca e que pode ter um impacto no balanço hídrico, esta poderá ser uma explicação para os teores de água diminuírem nas plantas contaminadas com cádmio. O Cd e Mn são antagónicos, sendo a absorção de Mn afetada pela presença de Cd.

O ferro é um dos elementos chave para a nutrição das plantas e a sua deficiência devido à presença de metais pesados pode influenciar bastante o metabolismo da planta. A limitação de Fe nas folhas está associada ao aparecimento de cloroses e/ou degradação do sistema fotossintético, tal como observado por Clemens (2006) e no presente trabalho (**Figura 5.15**).

#### **5.4.2.1.3. Caracterização da resposta da planta adulta**

Nas **Tabelas 5.5, 5.6 e 5.7** estão os resultados obtidos para a F20, R20 e FV20, da planta adulta, respetivamente.

**Tabela 5.7** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Cd.

		F20		
	Unidade	0 µM	5 µM Cd	15 µM Cd
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	198,3±16,1a*	905,8±38,2b*	711,1±66,6c*
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,15±0,01a	0,31±0,01b*	0,29±0,05b*
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse				
clorofila a	µmol g <sup>-1</sup>	0,78±0,06a*	0,53±0,09b	0,17±0,02c*
clorofila b	µmol g <sup>-1</sup>	0,21±0,02a*	0,12±0,02b	0,04±0,003c*
clorofila total	µmol g <sup>-1</sup>	0,98±0,08a*	0,62±0,12b	0,21±0,03c*
antocianinas	µmol g <sup>-1</sup>	0,05±0,01a	0,07±0,01a	0,13±0,01b*
compostos fenólicos	mg g <sup>-1</sup>	0,07±0,02a	0,17±0,03b*	0,19±0,03b
PAL	U g <sup>-1</sup>	0,27±0,02a	0,38±0,03b*	0,33±0,03ab
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	63,8±8,9a	128,4±20,3b	121,0±13,7b
% RSA	%	20,0±1,6	36,4±2,5b	36,7±3,2b
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	91,6±23,6a	83,5±7,0a	93,3±13,6a
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,07±0,02a	0,17±0,02b*	0,07±0,02a
POD	U g <sup>-1</sup>	0,25±0,05a	0,41±0,06a*	0,72±0,19b*
APX	U g <sup>-1</sup>	1,78±0,09a	3,62±0,66b*	2,98±0,28b
GPX	U g <sup>-1</sup>	75,5±13,7a	53,9±3,2a	54,5±5,3a*
GR	U g <sup>-1</sup>	0,10±0,01a	0,07±0,01b	0,05±0,01b
Metabolitos antioxidantes				
ASA	µmol g <sup>-1</sup>	1,60±0,18a*	1,75±0,10a	1,60±0,17a
DHA	µmol g <sup>-1</sup>	0,37±0,07a	1,18±0,12b*	1,15±0,10b*
ASC	µmol g <sup>-1</sup>	1,97±0,09a*	2,93±0,2b*	2,75±0,27b*
GSH	µmol g <sup>-1</sup>	1,3±0,1a	1,1±0,3a	1,8±0,3b*
GSSG	µmol g <sup>-1</sup>	0,14±0,01a*	0,35±0,02b*	0,10±0,01c*
TGSH	µmol g <sup>-1</sup>	1,44±0,1a	1,45±0,3a	1,90±0,3b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controlo.



**Tabela 5.8** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Cd.

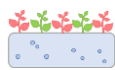
		R20		
	Unidade	0 µM	5 µM Cd	15 µM Cd
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	19,2±8,6a	42,2±5,3a	87,0±15,9b*
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,15±0,02a	0,14±0,02a	0,09±0,01b*
Defesa Antioxidante				
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	101,1±9,5a	79,1±10,0b	80,6±2,8b*
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,005±0,001a*	0,014±0,005b*	0,014±0,006b*
POD	U g <sup>-1</sup>	2,18±0,42a	1,77±0,12ab	1,46±0,13b
APX	U g <sup>-1</sup>	0,67±0,03a	0,53±0,06ab	0,44±0,10b
GR	U g <sup>-1</sup>	0,050±0,005a*	0,024±0,002b*	0,031±0,002b*
Metabolitos antioxidantes				
ASA	umol g <sup>-1</sup>	0.20±0,05a	0.66±0.13b	0.51±0,05b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.

**Tabela 5.9** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na FV20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Cd.

		FV20		
	Unidade	0 μM	5 μM Cd	15 μM Cd
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	μg g <sup>-1</sup>	251,7±60,2a	451,2±120,6b	800,6±88,0c
MDA	μM g <sup>-1</sup>	0,31±0,03a	0,55±0,04b	1,00±0,08c
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse				
compostos fenólicos	mg g <sup>-1</sup>	0,09±0,03a	0,74±0,14b	0,63±0,06b
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	88,5±26,1a	372,3±30,0b	432,2±30,4b
% RSA	%	21,3±1,9	89,3±1,0b	91,9±0,8b
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	162,1±102,2a	642,0±1711,0a	133,2±6,6a
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,016±0,005a	0,066±0,017b	0,035±0,014ab
POD	U g <sup>-1</sup>	0,09±0,02a	0,35±0,09b	0,36±0,11b
APX	U g <sup>-1</sup>	0,59±0,04a	1,42±0,17b	1,32±0,07b
GR	U g <sup>-1</sup>	n.d.	0,04±0,01a	n.d.
Metabolitos antioxidantes				
ASA	μmol g <sup>-1</sup>	1,02±0,08a	1,61±0,52a	4,23±0,14b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; n.d. significa não detetado; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.

*Folha nova – 5 e 15  $\mu\text{M}$  Cd (planta adulta)*

Na F20, os teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e MDA aumentam significativamente relativamente à amostra controlo, para 5 e 15  $\mu\text{M}$ , ou seja, há a indicação de stresse oxidativo devido ao aumento da produção das ROS que desencadeia um aumento da peroxidação dos lípidos, evidenciando o aparecimento de danos oxidativos nas células. Estes resultados estão de acordo com outros autores que verificaram que também verificaram este aumento para ervilha (Dixit et al., 2001), brássicas (Armas et al., 2015; Nouairi et al., 2009; Nouairi et al., 2006; Qadir et al., 2004), *Arabidopsis thaliana* (Cuypers et al., 2011) e alface (Monteiro et al., 2009).

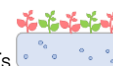
Na F20, com a exposição a 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cd, o teor de clorofila (a, b e total) diminui de forma significativa tal como ocorreu para a F2 exposta a 15  $\mu\text{M}$  de Cd. Este é um efeito que está de acordo com o que é referido por diversos autores (Dresler et al., 2014; Martins et al., 2013; Mohamed et al., 2012; Monteiro et al., 2009; Nouairi et al., 2006). Esta tendência também é evidente visualmente (**Figura 5.15**). Estes resultados podem ser, pelo menos em parte, explicados pela deficiência de Fe que está relacionada com a menor síntese de clorofilas (**Figuras 5.18**) (Dai et al., 2006; DalCorso et al., 2008) e, outra parte, através de danos diretos que o stresse oxidativo provoca na degradação da clorofila.

*Folha nova – 5  $\mu\text{M}$  Cd (planta adulta)*

A capacidade antioxidante total aumenta significativamente, em relação às plantas controlo, evidenciando que o sistema antioxidante da planta está ativo. Na folha nova exposta a 5  $\mu\text{M}$  de Cd não se observam diferenças significativas nos teores de antocianinas, comparativamente à amostra controlo, tal como se verifica visualmente (**Figura 5.15**). A exposição a esta concentração origina um aumento significativo dos compostos fenólicos presentes e na atividade da PAL, tal como verificado por Dai et al. (2006) em folhas de *Azolla imbricata* exposta durante 9 dias a concentrações baixas de Cd (0,4; 0,9; 4,4  $\mu\text{M}$  Cd). No presente estudo, existe uma tendência para o aumento da atividade da PAL e, por consequência, para o aumento da produção destes compostos que, provavelmente, resultam de um *oxidative burst* que ativa mecanismos para combater os ROS em excesso.

Apesar de não se observarem diferenças significativas nos teores de SOD, POD e GPX, verifica-se um aumento significativo na atividade da CAT e APX, podendo-se inferir que estas duas enzimas têm um papel ativo na remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A CAT atua na degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizando-o como substrato, sendo uma das principais enzimas envolvidas na remoção deste composto, daí o seu aumento significativo



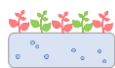
relativamente às plantas controlo. Esta enzima está relacionada com o controlo dos níveis de  $H_2O_2$  produzido em condições de stresse (Mittler, 2002), estando associada a uma remoção de  $H_2O_2$  quando este está em concentrações elevadas. Kovácik e Backor (2008) observaram que exposições curtas (1 dia) a 120  $\mu M$  de Cd estimularam a atividade da CAT.

Uma explicação possível para o aumento da atividade da APX é o facto de esta enzima apresentar uma elevada afinidade para o substrato  $H_2O_2$ , relativamente à CAT e POD. A APX atua neste substrato na ordem dos micromolar enquanto a CAT apresenta uma afinidade para este substrato para valores na ordem dos milimolar, o que promove uma função diferente de ambas as enzimas (Mittler, 2002). Esta enzima é crucial na conversão do  $H_2O_2$  em  $H_2O$ , usando o ascorbato como dador específico de eletrões. Apesar do teor de ASA não apresentar diferenças significativas, estes resultados estão concordantes com os valores obtidos para os teores de DHA, uma vez que APX está a converter o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  consumindo o ASA e dando origem à formação de DHA, daí o seu aumento significativo. Dixit et al. (2001) referiram que os níveis excessivos de  $H_2O_2$  foram removidos pela atividade da CAT e APX. Os autores verificaram que a atividade destas duas enzimas aumentou substancialmente em folhas quando expostas a 4  $\mu M$  de Cd, durante 7 dias de tratamento.

A GR é extremamente sensível aos metais tóxicos, como o Cd, Cu e Fe, e a compostos que reagem com os grupos  $-SH$ , devido à sua presença no centro ativo desta enzima (Nagalakshmi e Prasad, 2001), daí existir uma diminuição significativa na atividade enzimática da GR, nestas condições de ensaio. Este comportamento é acompanhado por um aumento no teor de GSSG, relativamente às plantas controlo. Esta forma oxidada, provavelmente, acumula-se uma vez que a GR tem a sua atividade diminuída.

#### *Folha nova – 15 $\mu M$ Cd (planta adulta)*

A exposição a 15  $\mu M$  também origina um aumento significativo na capacidade antioxidante total. Na folha nova, com a exposição a 15  $\mu M$  de Cd, já existe um aumento significativo na produção de antocianinas, sendo isso também observado visualmente (**Figura 5.15**). Tal como se verifica neste estudo, tem sido referido por vários autores que existe um aumento da sua produção em condições de stresse com Cd (Dai et al., 2012a; Mobin e Khan, 2007; Roychoudhury et al., 2012). Isto deve-se ao facto de a planta adulta estar exposta a um stresse durante um período mais prolongado, comparativamente à planta jovem, induzindo a produção de compostos antioxidantes, como as antocianinas. Os teores de compostos fenólicos também aumentam de forma significativa com a exposição a 15  $\mu M$  de Cd, não havendo, no entanto, diferenças significativas nos teores da PAL, tal como verificado por



(Kovacik et al., 2011) em folhas de *Matricaria chamomilla* (60  $\mu$ M, 7 dias). No entanto, existe uma tendência crescente na atividade enzimática da PAL, que está estreitamente relacionada com um aumento dos teores de compostos fenólicos e de antocianinas.

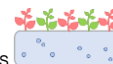
Nestas condições de ensaio, há um aumento significativo, comparativamente às plantas controlo, na atividade de enzimas antioxidantes, POD e APX, e nos teores de GSH. A SOD, CAT, GPX e GR não apresentam um papel fundamental nos mecanismos de defesa, face a estas condições de stresse.

A resposta da SOD ao stresse induzido por metais tóxicos depende de vários fatores, entre eles, a espécie da planta, o estágio de desenvolvimento, o tipo de metal e o tempo de exposição (Schutzendubel et al., 2001). A não observação de um comportamento da SOD em plantas expostas a Cd, indica que possivelmente todo o  $O_2^{\bullet-}$  é rapidamente convertido em  $H_2O_2$  devido ao *oxidative burst* que conduziu a uma rápida acumulação destas espécies, uma vez que a velocidade de produção foi mais rápida que a de remoção nas plantas de alface.

A POD é também uma enzima ativa na remoção do excesso de  $H_2O_2$  uma vez que ocorre uma indução da sua atividade enzimática, promovida pela presença de Cd, sendo significativamente superior ao controlo. É importante referir que esta enzima nos dá uma menor informação em relação aos mecanismos de tolerância face ao stresse oxidativo, devido à sua localização celular diversa e porque atua em diversos substratos para além do  $H_2O_2$ . A elevada atividade enzimática da POD, comparativamente à CAT, sugere que a POD poderá ser uma melhor resposta intrínseca. Este aumento da atividade da POD também pode estar diretamente relacionado com o aumento da produção de compostos fenólicos (Lopez-Martin et al., 2008; Mika et al., 2004). Monteiro et al. (2009) referem que em alface exposta a 100  $\mu$ M, ao fim de 14 dias de exposição, houve a ativação de peroxidases de modo a reduzir o impacto da toxicidade do Cd. Outros autores também referem um aumento da atividade da POD em resposta a um stresse induzido por Cd em folhas de tabaco (Martins et al., 2011), *Typha angustifolia* (Bah et al., 2011), arroz (Srivastava et al., 2014) e *Brassica juncea* (Armas et al., 2015).

No caso da APX, um aumento na sua atividade está concordante com os resultados obtidos para o teor de DHA e com a explicação referida anteriormente. A não existência de diferenças significativas para o ASA, deve-se provavelmente ao facto deste metabolito estar a ser consumido pela APX. Este efeito do aumento da atividade desta enzima em stresse induzido por Cd tem sido frequentemente descrita por outros autores em *Solanum nigrum* (Fidalgo et





al., 2011), *Brassica juncea* (Iqbal et al., 2010), *Arabidopsis thaliana* (Cuypers et al., 2011), tomate não-enxertado (Gratão et al., 2015) e *Brassica rapa* (Moreira et al., 2015).

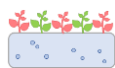
Há uma produção significativa de GSH (Sobrino-Plata et al., 2014) e daí o teor de GSSG também diminuir. Este aumento na produção de GSH devido à presença de Cd também tem sido verificado por outros autores em *Ceratophyllum demersum* (Mishra et al., 2009), *Brassica juncea* (Iqbal et al., 2010; Mohamed et al., 2012) e *Arabidopsis thaliana* (Cuypers et al., 2011; Jozefczak et al., 2014).

No presente estudo, com a exposição das plantas de alface a 15  $\mu\text{M}$ , a GR diminui devido à presença de Cd que inativa enzimas que apresentam grupos tiol, como é o caso desta enzima. Esta diminuição significativa da atividade da GR é acompanhada pela tendência decrescente observada para a atividade da GPX. Alguns estudos referidos por Cuypers et al. (2010) revelaram que pode ocorrer uma diminuição da atividade da GPX, durante o stresse com Cd, provavelmente devido a dois fatores: a possibilidade de existir um mecanismo subjacente que leva à diminuição do selênio (Se) presente no centro ativo da GPX, através da formação de um complexo Cd–Se–cys, ou competição entre a GPX e as metalotioneínas pelo enxofre presente nos aminoácidos. Aravind e Prasad (2005) verificaram que 10  $\mu\text{M}$  Cd não foram suficientes para estimular a atividade da GPX, em *Ceratophyllum demersum*, tal como aconteceu no presente trabalho.

#### *Folha velha – 5 e 15 $\mu\text{M}$ Cd (planta adulta)*

Nas folhas velhas, a tendência observada para as folhas novas mantém-se. Há um aumento dos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e MDA para as plantas contaminadas com 5 e 15  $\mu\text{M}$ , relativamente ao controlo. Isto indica a presença de stresse oxidativo que desencadeia danos oxidativos nas FV20. Na FV20 também existe um aumento da produção de compostos fenólicos para 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cd, sendo bastante superiores na FV20 quando comparados com os obtidos na F20.

A capacidade antioxidante é visivelmente superior na FV20, relativamente à F20, uma vez que as folhas velhas estiveram expostas durante mais tempo ao stresse, sendo isso comprovado também pelos valores superiores obtidos nos teores de MDA. Este aumento da capacidade antioxidante indica que a presença de Cd levou a planta a ativar mecanismos de defesa, como as enzimas antioxidantes. Com a exposição a 5  $\mu\text{M}$  de Cd aumenta significativamente a atividade da CAT, POD e APX, enquanto a exposição a 15  $\mu\text{M}$  de Cd apenas ativa a POD e APX. Para esta concentração mais elevada, este aumento na atividade da APX é acompanhado por um aumento significativo no teor de ASA. A APX, por apresentar



uma elevada afinidade para o substrato  $H_2O_2$ , parece ser a enzima relevante na remoção de peróxido para as duas concentrações de Cd testadas, sendo uma enzima crucial na conversão do  $H_2O_2$  em  $H_2O$ , usando o ascorbato como dador específico de eletrões.

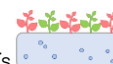
*Raiz – 5  $\mu M$  Cd (planta adulta)*

Na R20, com 5  $\mu M$  não há diferenças significativas nos teores de  $H_2O_2$  e MDA comparativamente à amostra controlo, parecendo indicar que não existem indicadores de stresse nem se manifestam danos oxidativos. Para esta concentração há um aumento da atividade da CAT, que muito provavelmente está a remover o excesso de  $H_2O_2$  presente, pois há um aumento do seu teor. A concentração de ASA aumenta significativamente, parecendo indicar que este metabolito antioxidante é crucial na defesa da planta (Cuypers et al., 2011; Mohamed et al., 2012), podendo também estar ativo na remoção dos níveis de peróxido presentes, evitando a sua acumulação.

*Raiz – 15  $\mu M$  Cd (planta adulta)*

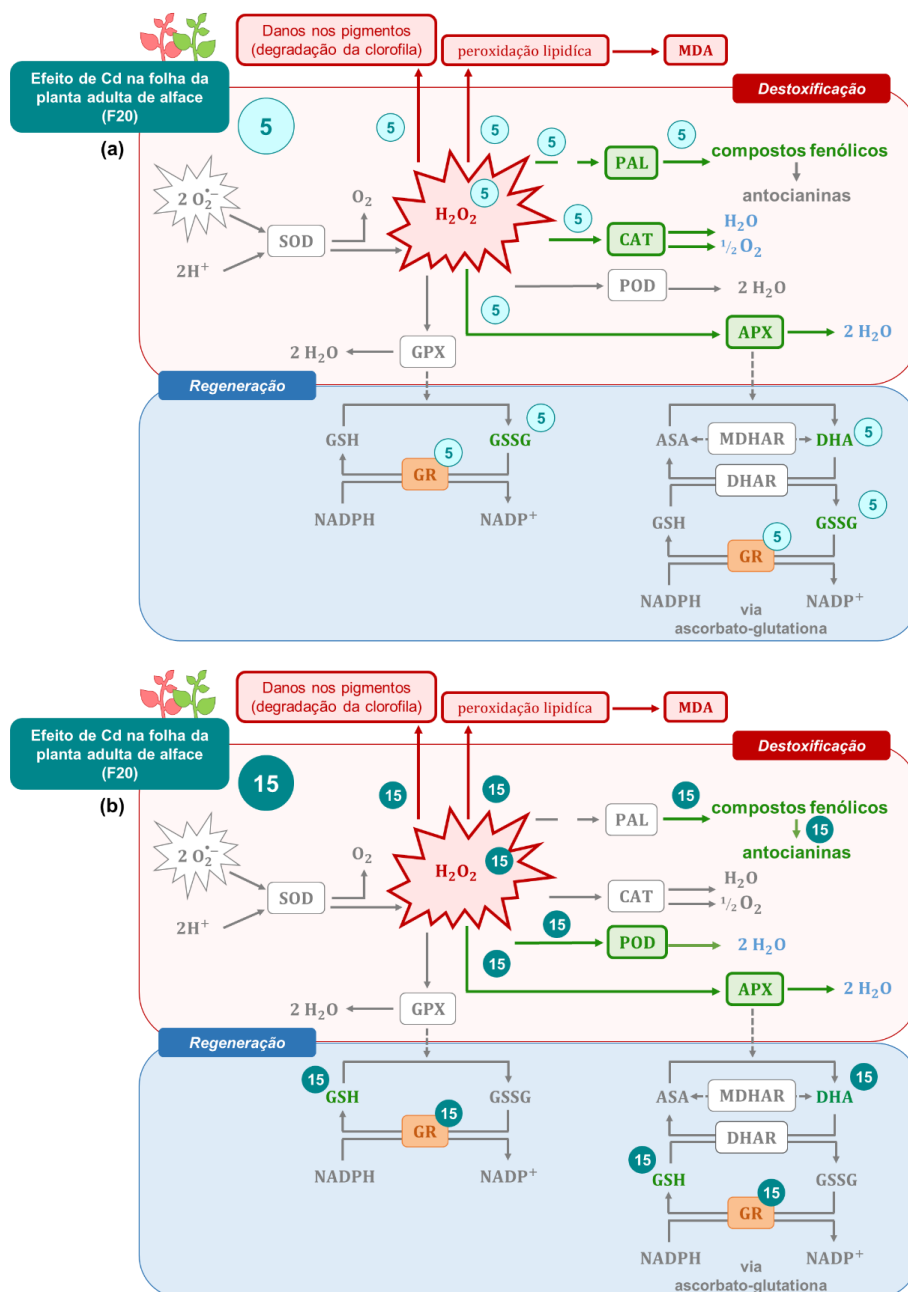
Apenas a exposição a 15  $\mu M$  leva a um aumento significativo do teor de peróxido presente, havendo, no entanto, uma diminuição significativa do teor de MDA, na R20. O facto de se observar uma diminuição significativa no teor de MDA, apesar de ser o órgão com maior concentração de Cd acumulado (**Figura 5.17**), demonstra o eficiente sistema antioxidante da planta de alface, o que é confirmado pela ausência de peroxidação lipídica nestes órgãos ao contrário do que acontece nas folhas.

Este sistema antioxidante baseia-se no aumento significativo da CAT e de ASA. A atividade enzimática da SOD, POD, APX e GR diminuem significativamente com a exposição a 15  $\mu M$  de Cd indicando que estas enzimas não estão envolvidas na remoção do  $H_2O_2$ , ou que as próprias enzimas estão a ser afetadas pelos teores mais elevados de Cd. A capacidade das plantas em aumentar a proteção antioxidante para combater o efeito negativo da presença de Cd parece ser limitada. Vários estudos demonstraram que a exposição a elevadas concentrações de Cd resultou numa diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (Ekmekci et al., 2008; Nouairi et al., 2009; Smeets et al., 2008). Isto está concordante com os resultados obtidos para a R20, principalmente com a exposição a 15  $\mu M$  de Cd, onde existe a inibição da maior parte das enzimas com exceção da CAT.



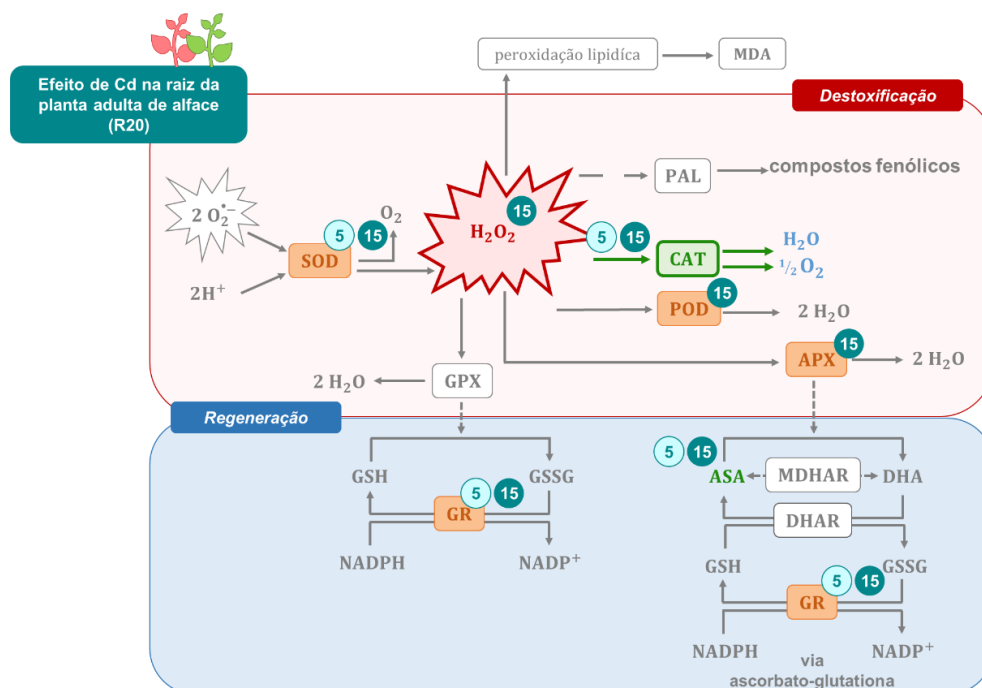
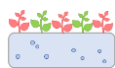
#### 5.4.2.1.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta adulta face à toxicidade induzida por Cd

Nas Figuras 5.19 e 5.20 encontra-se uma representação esquemática da resposta antioxidante, em F20 e R20, de alface M4E contaminada com 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cd.



**Figura 5.19** – Representação esquemática da resposta antioxidante em F20 de alface M4E contaminada com (a) 5 e (b) 15  $\mu\text{M}$  de Cd (indicado na figura como 5 e 15).

A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais. A laranja estão representados os mecanismos enzimáticos que diminuem na defesa.



**Figura 5.20** – Representação esquemática da resposta antioxidante em R20 de alface M4E contaminada com 5 e 15 µM de Cd (indicado na figura como 5 e 15).

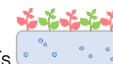
A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais. A laranja estão representados os mecanismos enzimáticos que diminuem na defesa.

Os resultados mais relevantes obtidos para a F20 e R20, confirmam que o sistema antioxidante enzimático atua de forma concertada com o sistema antioxidante não-enzimático, envolvendo, nomeadamente, o ASA e a GSH.

A comparação dos níveis de  $H_2O_2$  e MDA obtidos, em folhas e raízes, parecem indicar que as folhas são órgãos mais suscetíveis ao stresse induzido pelo Cd. Os resultados obtidos indicam uma concentração de  $H_2O_2$  bastante superior nas folhas comparativamente às raízes.

Em folhas, é notória a ativação de enzimas para combater o stresse induzido por estas condições de ensaio. As enzimas cruciais na destoxificação na planta de alface são a CAT, POD e APX. A degradação da clorofila, com o aparecimento de cloroses, a produção de antocianinas e o aumento do teor de compostos fenólicos aparentemente também parecem ser indicadores do stresse provocado pelo Cd.

Na raiz da planta adulta, o tempo de exposição já desencadeia uma resposta antioxidante na planta. A destoxificação é assegurada pela CAT, que é fundamental na remoção do excesso



de peróxido presente, aliada à síntese de ASA, que também tem um papel ativo na proteção contra os ROS.

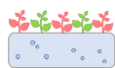
### *Conclusões intercalares*

Nas plantas jovens (expostas a 2 dias de contaminação com 5 ou 15  $\mu\text{M}$  de Cd) apesar de se verificar uma acumulação de Cd significativa, não se observaram sintomas visíveis de toxicidade, nem diferenças significativas na biomassa da parte aérea e raiz, ao contrário do que se verifica na planta adulta.

Nesta fase de crescimento (20 dias de contaminação com 5 ou 15  $\mu\text{M}$  de Cd), a exposição a 5  $\mu\text{M}$  apenas origina uma diminuição no tamanho das plantas de alface, enquanto a contaminação com 15  $\mu\text{M}$  já provoca o aparecimento de sintomas mais intensos de toxicidade, nomeadamente, cloroses e acastanhamento das folhas, aparecimento de folhas avermelhadas e um crescimento atrofiado da raiz, com necroses nas extremidades. Para ambas as concentrações de cádmio aplicadas verifica-se uma diminuição significativa na biomassa da raiz e parte aérea, sendo mais intensa quanto maior a concentração de Cd em solução nutritiva. A parte aérea é mais afetada em termos de diminuição da biomassa que a raiz.

O Cd parece ter alguma interferência na absorção de água pela planta, tanto na planta jovem como na planta adulta. O Cd interfere com a absorção de outros elementos químicos essenciais ao crescimento normal da planta devido a este ligeiro desequilíbrio osmótico ou pela competição entre elementos químicos semelhantes na entrada pela raiz tanto na planta jovem ( $\downarrow$  Fe, Na, Ca, Mg, Mn;  $\uparrow$  Ca) como na planta adulta ( $\downarrow$  K, Fe, Na, Mn;  $\uparrow$  Ca, Zn). Estes resultados podem também estar relacionados com a inibição do crescimento da raiz que, por consequência, diminui a absorção dos vários nutrientes.

A acumulação de Cd ocorre maioritariamente na raiz, sendo, no entanto, uma quantidade considerável também translocada para a parte aérea da planta. Esta capacidade de acumulação de Cd na raiz não demonstra variar entre estados de desenvolvimento da planta. Isto pode ser explicado pelo facto de este órgão estar em contacto direto com o contaminante e, para além disso, a entrada de Cd nas plantas ter os mesmos transportadores que outros elementos essenciais, podendo indicar uma dificuldade por parte da planta em conseguir distinguir os contaminantes dos nutrientes. Uma explicação para esta acumulação preferencial de Cd na raiz também pode ocorrer devido a uma possível retenção deste



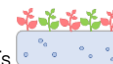
elemento nas paredes celulares ou a ligação a quelatos, sendo posteriormente armazenado em vacúolos.

A planta adulta acumula quantidades bastante superiores de Cd comparativamente à planta jovem, muito provavelmente porque a planta adulta esteve durante mais tempo exposta ao contaminante. A concentração de Cd presente em folhas de plantas jovens e adultas de alface expostas durante 2 e 20 dias, a 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cd, ultrapassa em qualquer um dos casos o valor permitido por lei de 0,2 mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  MF (Comission Regulation (EU) 488/2014). Ao fim de 2 dias de exposição as folhas acumularam  $1,99 \pm 0,15$  mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  MF quando sujeitas a 5  $\mu\text{M}$  e  $4,70 \pm 0,57$  mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  MF quando sujeitas a 15  $\mu\text{M}$ . Na planta adulta, as folhas acumulam  $10,98 \pm 0,36$  mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  MF (5  $\mu\text{M}$ ) e  $28,11 \pm 0,33$  mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  MF (15  $\mu\text{M}$ ), tendo em consideração que os teores médios de água nas folhas de alface.

Na resposta da planta face à toxicidade induzida pela presença de Cd, nas folhas da planta jovem exposta a 5  $\mu\text{M}$ , o ASA é o principal responsável por manter baixos os níveis de peróxido de hidrogénio e por não se manifestarem danos oxidativos. Na exposição a 15  $\mu\text{M}$  de Cd já existe um aumento nos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , existindo também degradação da clorofila apesar de não se verificarem sintomas nas plantas. Os mecanismos de defesa ativos para combater o stresse oxidativo consistem na atuação de ASA e na ativação de outros mecanismos (PAL, compostos fenólicos). Na raiz não se observa a ativação de mecanismos de defesa nem efeitos adversos, provavelmente, porque o Cd fica retido na raiz quelatado e armazenado nos vacúolos.

A planta adulta apresenta uma resposta mais intensa que a verificada para a planta jovem e verifica-se que o sistema antioxidante enzimático atua de forma organizada com o sistema não-enzimático (ASA, GSH). É importante referir que, nestas condições de ensaio, a presença de teores elevados de cádmio pode tanto ativar enzimas importantes nestes mecanismos antioxidantes como inibir a atividade de enzimas cruciais (GR, SOD, POD, APX).

Em folhas novas, tanto a exposição a um nível de concentração baixo ou elevado induzem uma resposta muito intensa na planta. A exposição a 5  $\mu\text{M}$  provoca um aumento nos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , havendo peroxidação lipídica ( $\uparrow$  MDA) e danos nos pigmentos (clorofila). Neste caso, há aumento da atividade da PAL e síntese de compostos fenólicos, assim como a ativação de enzimas antioxidantes (CAT, APX) que tentam controlar os níveis de ROS em excesso existentes. Com a exposição a uma concentração superior de Cd (15  $\mu\text{M}$ ), continua a existir um aumento nos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que resultam em danos oxidativos nos lípidos e na degradação de clorofila (cloroses observadas visualmente). Neste caso, há a ativação da



síntese de compostos fenólicos e a produção de antocianinas (observado visualmente), assim como o aumento na atividade enzimática de enzimas antioxidantes (POD, APX) e de GSH, que estão ativos na eliminação das ROS em excesso.

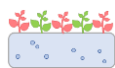
Nas folhas velhas, a resposta da planta é mais intensa, uma vez que estas estiveram durante um maior período de tempo expostas ao stresse, sendo isso comprovado pelos valores elevados de  $H_2O_2$  e MDA. Por este motivo são ativados mecanismos de defesa nas folhas contaminadas com 5  $\mu M$  (compostos fenólicos, CAT, POD, APX) e 15  $\mu M$  (compostos fenólicos, POD, APX, ASA).

Na raiz, já existe uma resposta das plantas contaminadas, comparativamente à planta jovem. Esta resposta consiste na ativação da CAT e ASA, para controlar os níveis de  $H_2O_2$ . Apesar de a raiz ser o órgão com maior concentração de Cd presente, não se verificam danos oxidativos, o que demonstra o eficiente sistema antioxidante da planta de alface que é confirmado pela ausência de peroxidação lipídica na raiz, ao contrário do que acontece nas folhas.

As folhas são órgãos mais suscetíveis ao stresse induzido pela presença de Cd, comparativamente às raízes, para ambos os estados de desenvolvimento da planta. A raiz é o órgão onde ocorre a maior acumulação deste elemento, podendo este ficar retido nas paredes celulares, existindo menos Cd disponível para provocar um efeito negativo nas células. Aliado a este comportamento, os mecanismos de resposta responsáveis pela degradação e/ou eliminação do  $H_2O_2$  parecem ser bastante eficientes na raiz.

Para ambos os estados de desenvolvimento é importante referir que a presença de diferentes concentrações de cádmio permite ativar diferentes mecanismos de resposta. Os resultados obtidos indicam que a capacidade de resposta da planta difere consoante a intensidade do stresse.



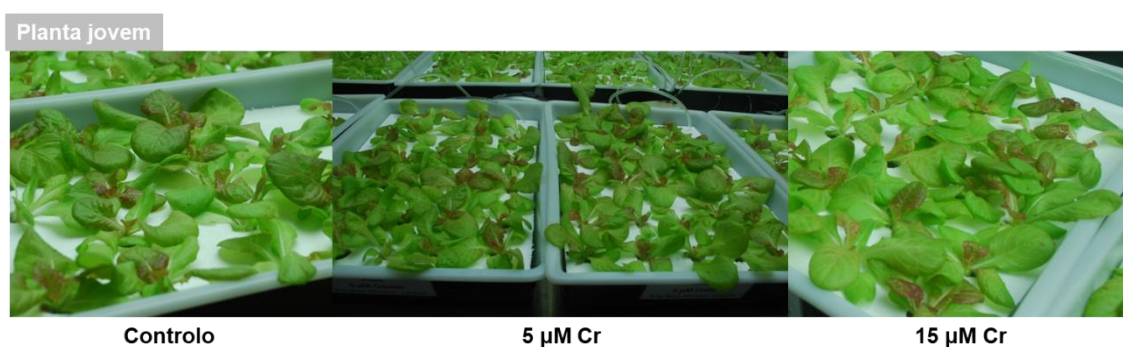


## 5.4.2. Crómio

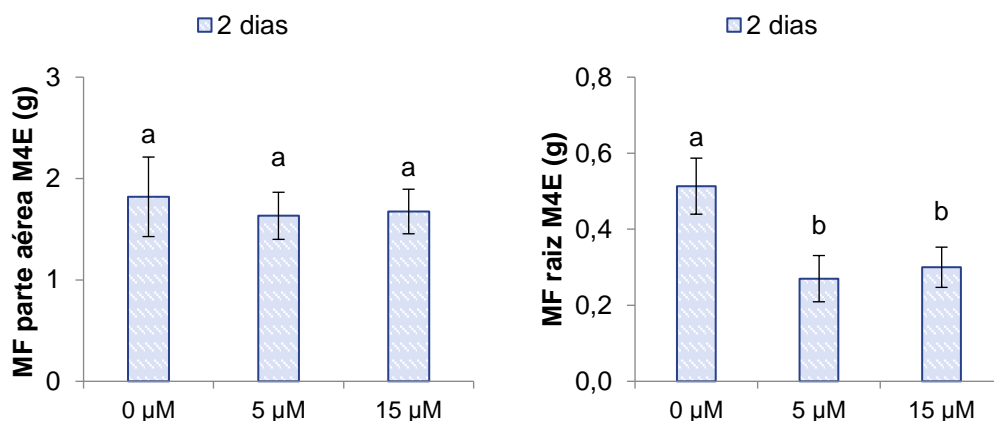
### 5.4.2.1. Planta jovem

#### 5.4.2.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Cr

Na **Figura 5.21** encontram-se o registo fotográfico para a planta jovem exposta às diferentes modalidades (controlo, 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cr). Na **Figura 5.22** encontram-se os resultados obtidos para a massa fresca, da parte aérea e da raiz, da planta jovem.



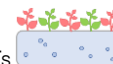
**Figura 5.21** – Registo fotográfico da planta jovem de alface M4E ao 2º dia de exposição com Cr.



**Figura 5.22** – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas jovens de alface M4E ao fim de 2 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cr.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controlo ( $n=3$ ).

Na planta jovem não se observam visualmente sintomas de toxicidade, tanto na parte aérea como na raiz, indicando que este nível de contaminação com crómio (5, 15  $\mu\text{M}$ ) durante este



período de tempo (2 dias de contaminação) não permite que se observem visualmente efeitos tóxicos nas plantas jovens de alface.

A biomassa da parte aérea das plantas contaminadas com 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cr decresce ligeiramente, quando comparada com o controlo, no entanto, essas diferenças na massa fresca da parte aérea não são significativas. Na massa fresca da raiz existe uma diminuição significativa nas plantas contaminadas com crómio (5 e 15  $\mu\text{M}$ ), em relação às plantas controlo. Este comportamento evidencia que existe um maior efeito do Cr neste órgão.

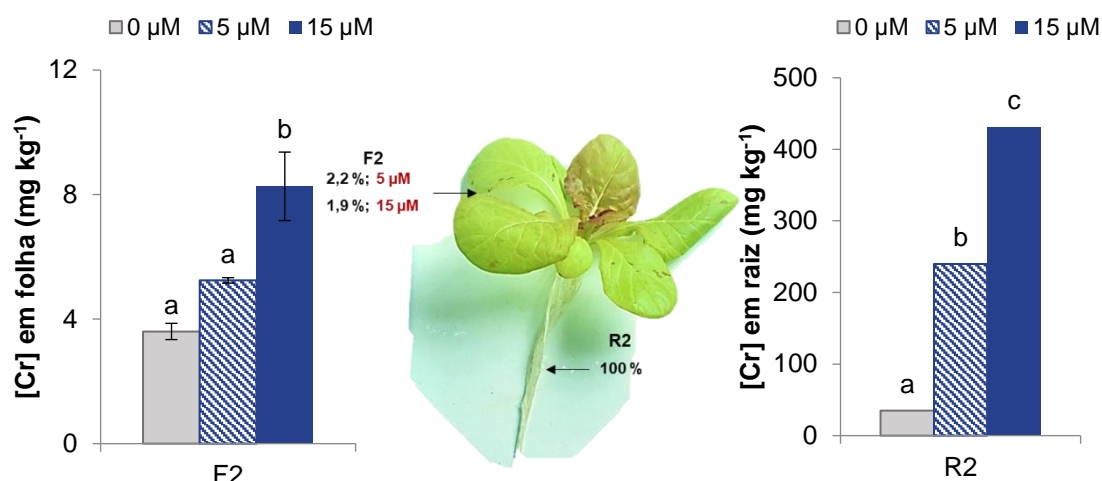
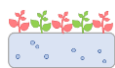
Neste caso, em que se verifica um efeito de diminuição na biomassa da raiz comparou-se os valores relativos à diminuição percentual da biomassa da parte aérea (5  $\mu\text{M}$ : 10,3 %, 15  $\mu\text{M}$ : 8,0 %) e da raiz (5  $\mu\text{M}$ : 47,4 %, 15  $\mu\text{M}$ : 41,6 %), sendo possível comprovar que a raiz da planta jovem é, claramente, mais afetada pela presença deste elemento. Este efeito de diminuição no crescimento da raiz devido à presença de Cr foi também referido no **Capítulo IV**.

Os valores médios das percentagens de humidade presentes nas plantas jovens também foram calculados para a biomassa da parte aérea e da raiz, por comparação com as plantas controlo. Verifica-se que existe uma diminuição gradual no teor de água das plantas controlo (parte aérea: 95,0 %; raiz: 92,7 %) em relação às plantas contaminadas com 5  $\mu\text{M}$  (parte aérea: 72,4 %; raiz: 70,1 %) e 15  $\mu\text{M}$  (parte aérea: 52,2 %; raiz: 53,3 %), com o aumento da concentração de Cr no meio exterior. A diminuição do tamanho da planta jovem deve-se, provavelmente, à diminuição significativa do crescimento da raiz que, por consequência, leva a uma diminuição da absorção de água e o seu posterior transporte para a parte aérea das plantas.

#### 5.4.2.1.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos

Na **Figura 5.23** apresentam-se os resultados para as concentrações de Cr acumuladas, em folha e raiz, na planta jovem contaminada com 5 e 15  $\mu\text{M}$ . É possível verificar que à medida que se aumenta a concentração de Cr na solução nutritiva, a planta jovem acumula uma maior quantidade deste elemento na raiz.

No entanto, nas folhas de plantas contaminadas com 5  $\mu\text{M}$ , este comportamento já não se verifica, não existindo diferenças significativas, em relação ao controlo, na acumulação de Cr em folhas de plantas jovens com esta contaminação. A exposição a 5  $\mu\text{M}$  de Cr não foi suficiente para que exista uma acumulação significativa na F2. Nas plantas expostas a 15  $\mu\text{M}$  de Cr observa-se um aumento significativo, comparativamente às plantas controlo.



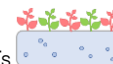
**Figura 5.23** – Concentração de Cr em folha e raiz de plantas jovens de M4E ao fim de 2 dias de exposição a 5 e 15 µM de Cr.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controlo ( $n=3$ ). Os valores indicados correspondem às percentagens de Cr nas folhas em relação à quantidade na raiz (considerada como 100 %).

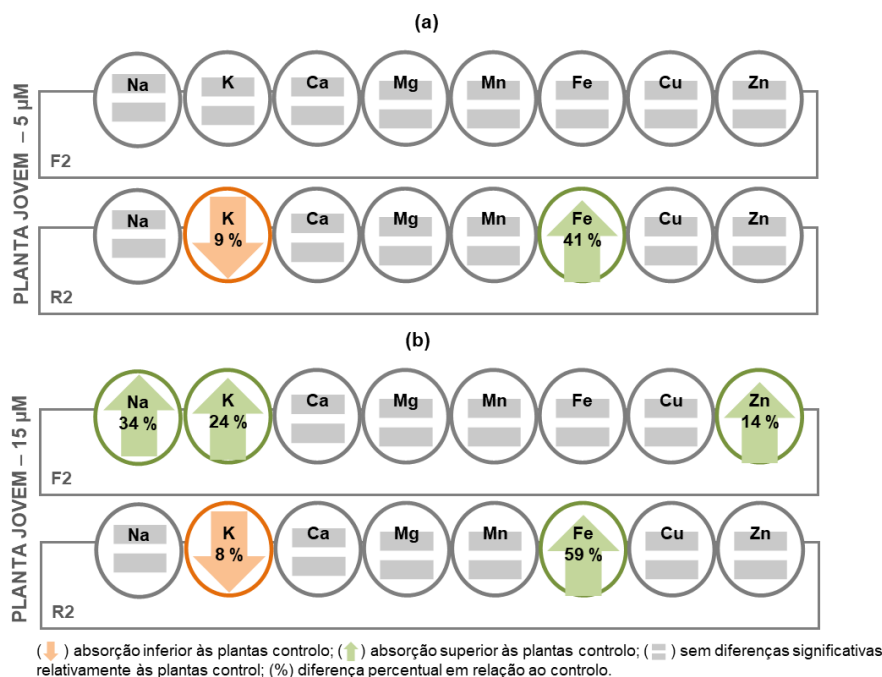
Na raiz, existe um aumento significativo na acumulação de Cr para todas as plantas contaminadas com crómio. Neste órgão, a exposição a 5 e 15 µM de Cr resulta numa acumulação muito superior, quando comparado com a quantidade acumulada na folha, existindo uma concentração de  $239,73 \pm 6,67$  e  $431,44 \pm 9,60$  mg de Cr kg<sup>-1</sup> MS, respetivamente. Na folha, a acumulação de Cr é de  $5,24 \pm 0,09$  (5 µM) e  $8,27 \pm 1,10$  mg de Cr kg<sup>-1</sup> MS (15 µM). Através destes resultados é possível verificar que o crómio se acumula preferencialmente na raiz da planta jovem de alface, este comportamento e a explicação para que ocorra foi descrito no **Capítulo IV**.

Apesar de se não verificarem efeitos visíveis de toxicidade na parte aérea, tal como se observa na **Figura 5.21**, a planta jovem de alface parece tolerar níveis bastante elevados de Cr na raiz.

Na **Figura 5.23** também estão representadas as percentagens de Cr translocadas para a parte aérea em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas jovens contaminadas com 5 e 15 µM de Cr. A quantidade de Cr na folha exposta a 5 e 15 µM é de apenas 2,2 e 1,9 %, respetivamente. É possível verificar que apenas uma pequena percentagem de Cr é translocada para a parte aérea da planta, evidenciando que este elemento é pouco móvel na planta ficando maioritariamente retido na raiz, tal como descrito no **Capítulo IV**.



Na **Figura 5.24** apresentam-se as principais tendências observadas na variação dos teores dos elementos químicos devido à presença de Cr em solução nutritiva, para a folha e raiz da planta jovem, respectivamente (os respectivos valores encontram-se na **Tabela B3**).

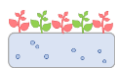


**Figura 5.24** – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F2 e R2 ao fim de 20 dias de exposição a 5 (a) e 15 µM (b) de Cr.

Na F2 exposta a 5 µM de Cr não se observaram diferenças significativas nos teores dos outros elementos químicos estudados. Este comportamento provavelmente ocorre porque, tal como verificado anteriormente, não existe uma acumulação significativa de Cr que provoque um desequilíbrio nos nutrientes absorvidos pela planta. Na R2, a acumulação de Cr já é superior e por isso, já se observa uma diminuição significativa no teor de K e um aumento bastante significativo na concentração de Fe.

A contaminação da planta jovem com 15 µM de Cr já origina um estímulo da absorção de Na, K e Zn pela F2. Na R2 observa-se exatamente o mesmo comportamento verificado para a exposição com 5 µM de Cr nas variações dos teores de elementos químicos.

Ao fim de 2 dias de exposição ao contaminante, estes resultados indicam que a contaminação com Cr afeta pouco a absorção de elementos químicos pela planta. Por outro lado, a presença de Cr parece, aparentemente, apresentar um efeito competitivo com o K na entrada pela raiz, e aumentar os níveis de Fe absorvidos.



Segundo a bibliografia, concentrações excessivas de Cr inibem a translocação de Fe e induzem sintomas característicos de deficiência em Fe nas plantas. No entanto, a interação Cr-Fe nem sempre é antagônica. A absorção de Cr pode aumentar a absorção de Fe pelas plantas, sugerindo que o Cr e o Fe são translocados de forma semelhante nas plantas (Bonet et al., 1991; Xu et al., 2015), o que provavelmente está relacionado com os resultados obtidos no presente estudo para as plantas jovens de alface contaminadas com crômio.

#### 5.4.2.1.3. Caracterização da resposta da planta jovem

Na **Tabela 5.10** estão os resultados obtidos para os parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Cr.

##### *Folha nova – 5 µM Cr (planta jovem)*

Na F2 exposta a 5 µM de Cr, não se observam diferenças significativas no teor intracelular de  $H_2O_2$  e de MDA, indicando que não existem indicadores de stresse oxidativo. Para esta concentração também não se observam diferenças significativas nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, nomeadamente na concentração de clorofilas, antocianinas e atividade da PAL. Também não se verificaram diferenças significativas na atividade antioxidante total, atividade de enzimas antioxidantes e nem no teor de ASA. Isto evidencia um menor grau de stresse oxidativo na planta jovem exposta a este tratamento.

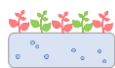
A exposição a 5 µM de Cr apenas desencadeia um aumento na produção de compostos fenólicos e no teor de GSH. Os compostos fenólicos são característicos da ativação de reações do metabolismo secundário, sendo também importantes na eliminação das ROS em excesso. O metabolito antioxidante não-enzimático, provavelmente, está ativo na remoção de  $H_2O_2$ , evitando que se formem danos oxidativos nas membranas. Gill et al. (2015a) observaram que os teores de GSH aumentaram com o aumento das concentrações de Cr nas folhas de todas as cultivares, sugerindo que as plantas dependem dos teores de GSH para neutralizar os efeitos adversos dos metais pesados. Os autores também referiram que níveis mais elevados destes compostos são fundamentais no controlo da formação de ROS durante um stresse induzido por Cr.



**Tabela 5.10** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Cr.

		F2		
	Unidade	0 µM	5 µM Cr	15 µM Cr
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	222,0±26,8a	247,5±28,6a	294,8±48,5a
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,26±0,02a	0,25±0,01a	0,26±0,04a
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse				
clorofila a	µmol g <sup>-1</sup>	0,44±0,05a	0,47±0,05a	0,44±0,01a
clorofila b	µmol g <sup>-1</sup>	0,10±0,01a	0,12±0,01a	0,10±0,01a
clorofila total	µmol g <sup>-1</sup>	0,54±0,06a	0,59±0,06a	0,54±0,02a
antocianinas	µmol g <sup>-1</sup>	0,07±0,01a	0,08±0,01a	0,12±0,01b
compostos fenólicos	mg g <sup>-1</sup>	0,10±0,01a	0,19±0,04b	0,15±0,04ab
PAL	U g <sup>-1</sup>	0,26±0,01a	0,30±0,08a	0,26±0,01a
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	156,8±12,5a	189,0±31,0a	210,8±26,3a
% RSA	%	43,6±7,6a	50,4±7,8a	38,2±6,5a
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	100,6±23,3a	110,4±6,2a	118,5±28,2a
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,11±0,01a	0,12±0,02a	0,06±0,01b
POD	U g <sup>-1</sup>	0,14±0,03a	0,21±0,03a	0,34±0,04b
APX	U g <sup>-1</sup>	1,32±0,11a	1,19±0,17a	1,19±0,16a
GPX	U g <sup>-1</sup>	81,7±3,4a	67,3±9,5a	80,4±4,8a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,06±0,01a	0,08±0,01ab	0,09±0,02b
Metabolitos antioxidantes				
ASA	µmol g <sup>-1</sup>	1,21±0,24a	1,44±0,04a	1,39±0,11a
DHA	µmol g <sup>-1</sup>	0,46±0,05a	0,21±0,02b	1,36±0,11c
ASC	µmol g <sup>-1</sup>	1,67±0,33a	1,65±0,10a	2,75±0,24b
GSH	µmol g <sup>-1</sup>	0,36±0,11a	1,00±0,10b	2,12±0,48c
GSSG	µmol g <sup>-1</sup>	0,29±0,05a	0,20±0,05ab	0,16±0,05b
TGSH	µmol g <sup>-1</sup>	0,65±0,07a	1,20±0,12b	2,28±0,49c

O símbolo ± representa o desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controlo.

*Folha nova – 15  $\mu$ M Cr (planta jovem)*

A exposição da F2 a 15  $\mu$ M de Cr, origina um aumento embora não significativo no teor de peróxido. Os resultados obtidos para os teores de MDA também sugerem a não existência de danos oxidativos.

Apesar de haver um ligeiro aumento na atividade antioxidante total, não se verificam diferenças significativas em relação ao controlo. Relativamente aos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, apenas ocorre um aumento significativo da produção de antocianinas, não existindo diferenças significativas na concentração de clorofilas, compostos fenólicos e PAL. Este aumento na produção de antocianinas não se observa visualmente quando comparado com as plantas controlo (**Figura 5.21**).

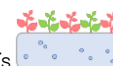
Há um aumento da atividade da POD e GR quando comparado com as outras enzimas antioxidantes (SOD, APX e GPX), que não estão envolvidas nos mecanismos de defesa face a este EPT, sendo a atividade da CAT até inibida pela presença de Cr em excesso. Deste modo, possivelmente, outros mecanismos de defesa estão a atuar nesta fase inicial de desenvolvimento da planta.

Esta tendência demonstra que a POD deve ser a responsável por remover o excesso de  $H_2O_2$ , o que poderá explicar o facto de não haver diferenças significativas ao nível do  $H_2O_2$ . A elevada atividade enzimática da POD, comparativamente à CAT, sugere que a POD poderá ser uma melhor resposta intrínseca face aos danos oxidativos induzidos pelo Cr nesta fase inicial (Qing et al., 2015).

O aumento da atividade da GR, aliado ao aumento significativo da GSH, indica que esta enzima também está ativa e é importante na defesa da planta face à presença de Cr. Qiu et al. (2013) demonstraram que o crescimento de plantas de arroz diminuiu quando estas foram expostas a 100  $\mu$ M de Cr. Os autores também verificaram que a adição exógena de GSH atenuou a toxicidade causada por este EPT, sendo isto também verificado por Zeng et al. (2012). Este aumento no teor de GSH em plantas expostas a Cr também foi verificado em arroz (Panda, 2007), *Salvinia natans* (Dhir et al., 2009) e *Brassica juncea* (Diwan et al., 2010).

Na **Tabela 5.11** estão os resultados obtidos para os parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Cr.





**Tabela 5.11** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Cr.

		R2		
	Unidade	0 µM	5 µM Cr	15 µM Cr
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	76,8±12,6a	72,1±15,8a	85,9±2,0a
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,18±0,01a	0,19±0,03ab	0,24±0,04b
Defesa Antioxidante				
<i>Enzimas antioxidantes</i>				
SOD	U g <sup>-1</sup>	140,7±17,0a	140,8±5,0a	112,6±11,7a
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,029±0,009a	0,030±0,004a	0,035±0,002a
POD	U g <sup>-1</sup>	2,1±0,4a	2,5±0,3a	32,1±14,1b
GR	U g <sup>-1</sup>	0,03±0,01a	0,03±0,01a	n.d.

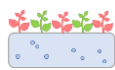
O símbolo  $\pm$  representa o desvio padrão; n.d. significa não detetado; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controlo.

#### *Raiz – 5 e 15 $\mu\text{M Cr}$ (planta jovem)*

Na R2, com a exposição a 5  $\mu\text{M}$  não se observam diferenças significativas nos teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de MDA, nem na atividade enzimática.

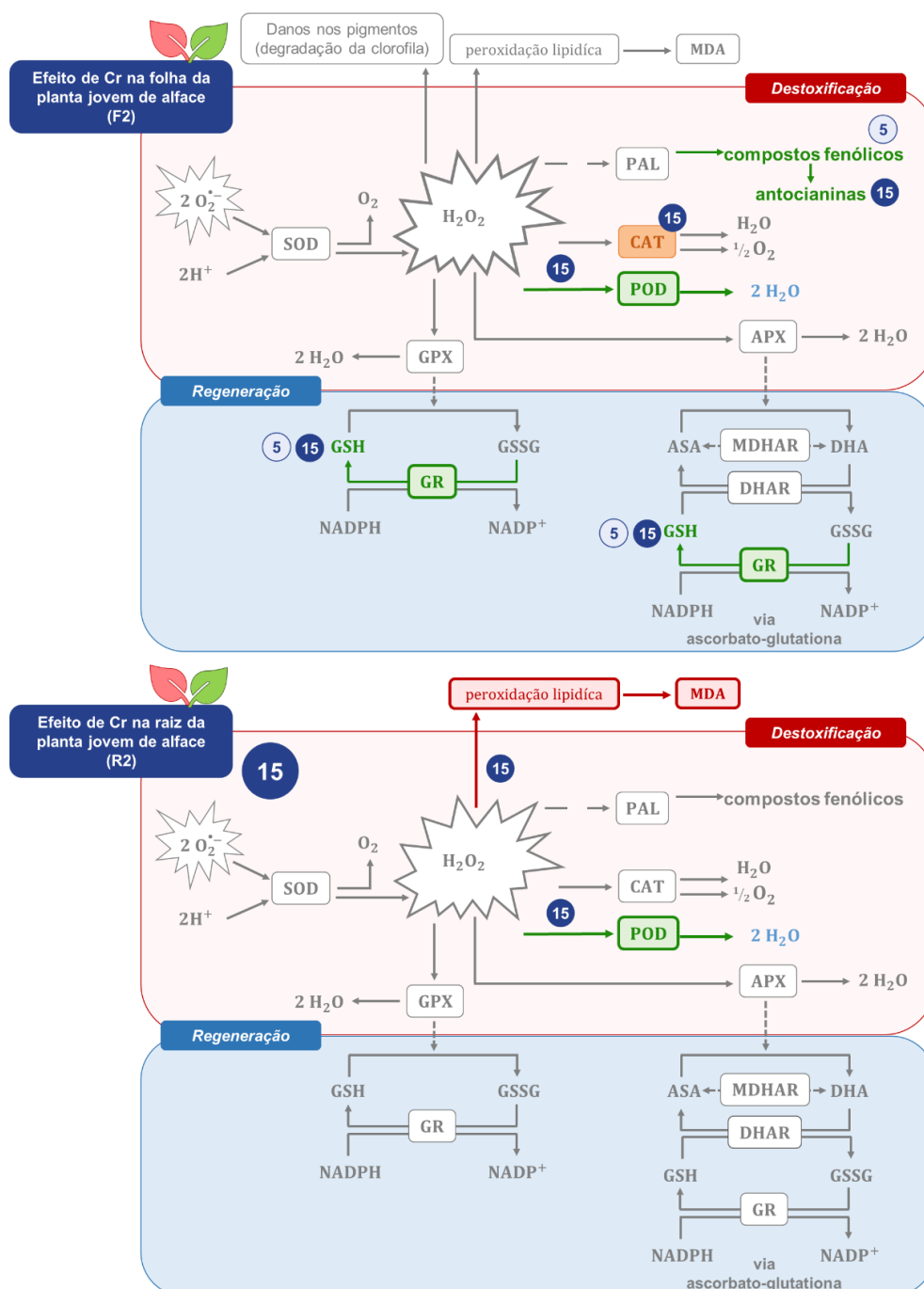
Na exposição a 15  $\mu\text{M}$  de Cr, não se observam diferenças significativas no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apesar de haver um ligeiro aumento em relação ao controlo. No entanto, ocorre um aumento significativo do teor de MDA, indicando que existe peroxidação lipídica. Pandey et al. (2005) também referiram que ocorreu uma acumulação de MDA preferencial nas raízes de *Brassica Juncea* (2 e 20  $\mu\text{M Cr}$ , 15 dias). Shanker e Pathmanabhan (2004) verificaram que a exposição a 50  $\mu\text{M}$  de Cr aumentou os teores de MDA em raízes e na parte aérea de *S. bicolor*, ao fim de 10 dias de contaminação (50 e 100  $\mu\text{M}$ ), sendo esse aumento superior nas raízes.

Relativamente à defesa antioxidante, a POD é a única enzima ativa, uma vez que aumenta significativamente a sua atividade comparativamente ao controlo. Esta enzima está ativa na remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em excesso, tal como ocorreu nas F2 expostas a 15  $\mu\text{M}$  de Cr, no entanto a sua atividade não impede que existam danos oxidativos neste órgão. A SOD, CAT e GR, aparentemente, não são fundamentais no mecanismo de destoxificação na raiz.



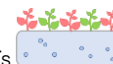
#### 5.4.2.1.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta jovem face à toxicidade induzida por Cr

Na planta jovem, a avaliação da resposta antioxidante de plantas expostas a Cr está representada para a folha e raiz (**Figura 5.25**).



**Figura 5.25** – Representação esquemática da resposta antioxidante em F2 de alface M4E contaminada com 5 e 15 µM de Cr (indicado na figura como 5 e 15).

A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais.



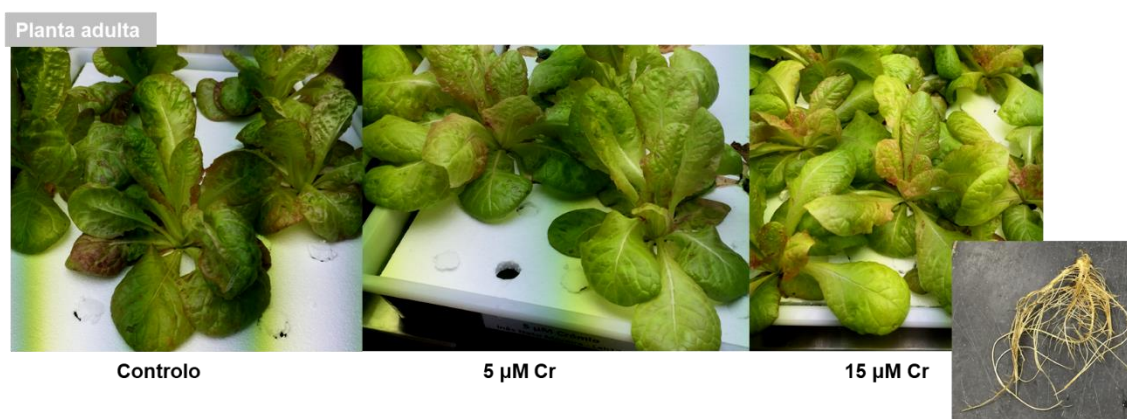
É na raiz que existe uma acumulação maior de Cr, e provavelmente, por isso é na R2 que existem danos oxidativos manifestando uma maior sensibilidade deste órgão a este elemento. Na raiz, a exposição a 5  $\mu\text{M}$  de Cr não teve nenhum efeito nos mecanismos de defesa estudados o que revela que possivelmente parte deste elemento fica retido na raiz na forma de quelatos ou nas paredes celulares, sendo posteriormente armazenado nos vacúolos. Por este motivo, não se apresenta um esquema para estas condições de stresse. A contaminação com 15  $\mu\text{M}$  já desencadeia a ativação da POD, tal como acontece nas folhas, estando ativa na remoção de peróxido de hidrogénio mas não evitando o aparecimento de danos oxidativos.

Embora se tenham acumulado pequenas quantidades de Cr na folha, esta exposição induz a produção de compostos fenólicos e de antocianinas, aliada ao aumento das atividades enzimáticas da POD e GR, que é acompanhada com a síntese significativa de GSH. Este comportamento evidencia uma resposta da planta jovem face à presença de Cr.

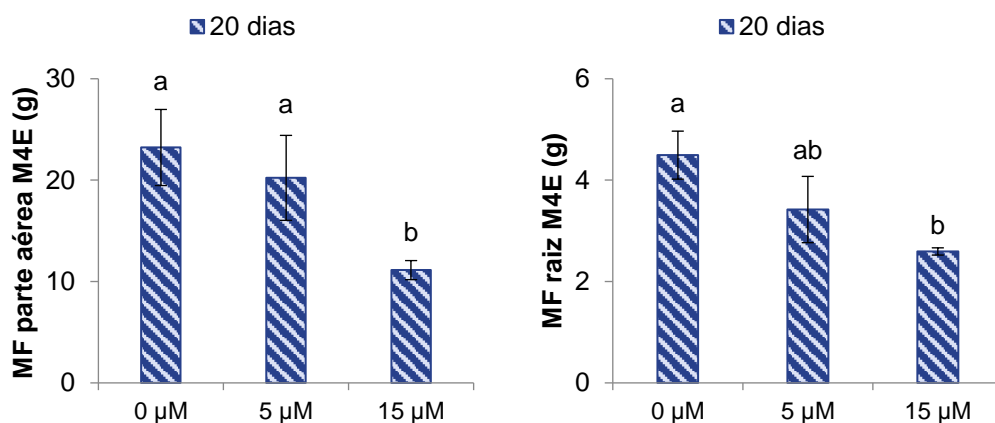
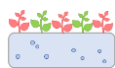
#### 5.4.2.2. Planta adulta

##### 5.4.2.2.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Cr

Na **Figura 5.26** encontram-se o registo fotográfico obtido para as plantas adultas, controlo e contaminadas com 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cr. Na **Figura 5.27** apresentam-se os resultados obtidos para a massa fresca, da parte aérea e da raiz, da planta adulta.



**Figura 5.26** – Registo fotográfico da planta adulta de alface M4E ao 20º dia de exposição com Cr.



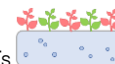
**Figura 5.27** – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas adultas de alfafa M4E ao fim de 20 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 5 e 15 µM de Cr.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).

Na planta adulta exposta a 5 µM de Cr não se verifica o aparecimento de sintomas visíveis de toxicidade. Na planta adulta contaminada com 15 µM já se observa uma diminuição do tamanho das plantas, bem como o aparecimento de antocianinas nas folhas novas, cloroses nas folhas mais velhas. O desenvolvimento da raiz é bastante afetado, ocorrendo o seu amarelecimento e menor formação de raízes secundárias. Chatterjee e Chatterjee (2000) verificaram que o Cr foi o elemento que originou menos efeitos visíveis em couve-flor, comparativamente à presença de Co e Cu, verificando-se o aparecimento de cloroses nas folhas após 10-12 dias de exposição a 500 µM de Cr. Liu et al. (2008) também observaram o aparecimento de cloroses, características de plantas com deficiência em Fe, em folhas de *Amaranthus viridis* L. sujeitas a 1-100 µM de Cr, durante 20 dias. A inibição do crescimento e estes sintomas visíveis de toxicidade induzidos pela presença de crômio já foram referidos e abordados no **Capítulo IV**.

Na planta adulta, tanto a massa fresca da parte aérea como da raiz, apresenta uma tendência para diminuir com o aumento da concentração de Cr em solução nutritiva, sendo essa diminuição apenas significativa para a concentração de 15 µM de Cr, em relação ao controle.

Se se calcularem os valores relativos à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controle, é possível verificar que com a contaminação de 5 µM existe uma diminuição de 12,9 % na parte aérea, e de 23,9 % na raiz. Nas plantas contaminadas com 15 µM, verifica-se uma diminuição superior 52,1 % e de 42,3 %, para a parte aérea e raiz, respetivamente. Através da observação dos resultados é possível verificar



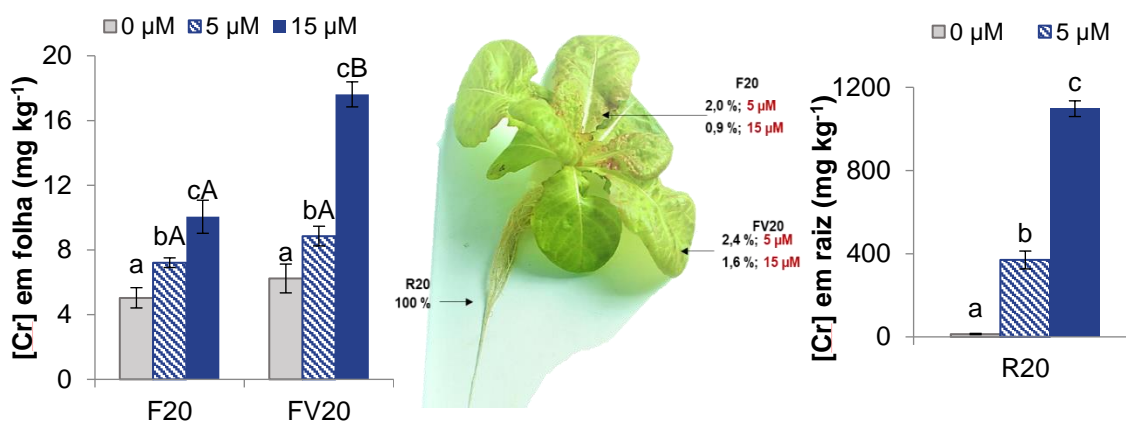
que quanto maior a concentração de Cr presente na solução nutritiva, maior o efeito na diminuição da biomassa dos diferentes órgãos. E este efeito de diminuição é semelhante tanto para a parte aérea e raiz, não havendo grandes variações nos valores percentuais obtidos, tal como verificado no **Capítulo IV** (embora tenham sido utilizadas concentrações superiores de crómio).

No presente trabalho calculou-se os valores médios das percentagens de humidade para a biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controlo, considerando-se a exposição ao fim de 20 dias com 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cr. Verifica-se que existe uma ligeira diminuição no teor de água das plantas controlo (parte aérea: 97,8 %; raiz: 92,4 %) em relação às plantas contaminadas com 5  $\mu\text{M}$  (parte aérea: 92,4 %; raiz: 85,5 %) e uma acentuada diminuição para as plantas expostas a 15  $\mu\text{M}$  (parte aérea: 45,6 %; raiz: 60,4 %).

A diminuição do tamanho das plantas contaminadas com 15  $\mu\text{M}$  deve-se à diminuição do crescimento da raiz que, por consequência, leva a uma diminuição da absorção de água e, provavelmente, de nutrientes e o seu posterior transporte para a parte aérea das plantas.

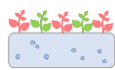
#### 5.4.2.2.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos

Os resultados da acumulação de Cr na folha e raiz da planta adulta estão apresentados na **Figura 5.28**.



**Figura 5.28** – Concentração de Cr em folha e raiz de plantas adultas de M4E ao fim de 20 dias de exposição a 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cr.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controlo ( $n=3$ ). As letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre F20 e FV20. Os valores indicados correspondem às percentagens de Cr nas folhas em relação à quantidade na raiz (considerada como 100 %).



Na planta adulta, quanto maior a quantidade de Cr aplicada no meio, maior a quantidade acumulada nos diferentes órgãos da planta.

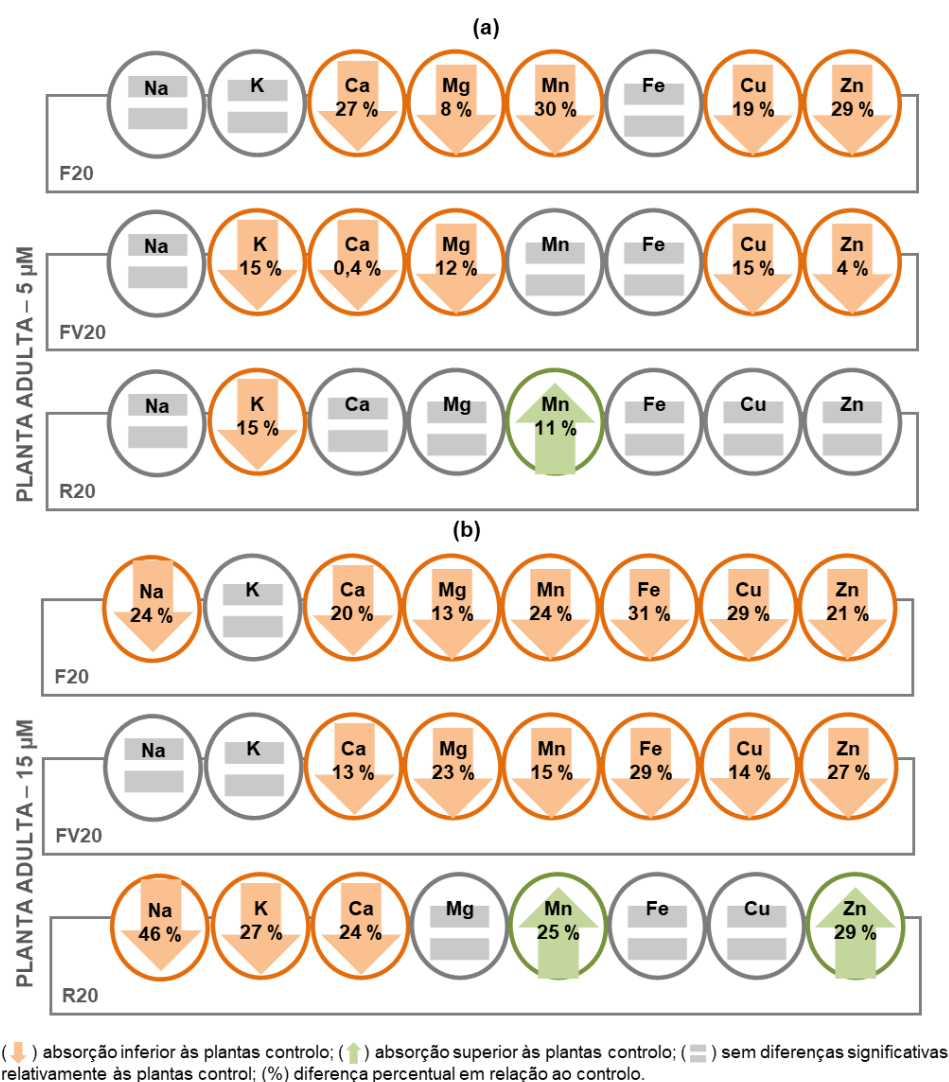
Apesar de o tempo de exposição ter sido superior, a F20 acumula  $7,21 \pm 0,30$  e  $10,05 \pm 1,02$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MS, quando exposta a 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cr, respetivamente. A quantidade acumulada de Cr na FV20 é ligeiramente superior à obtida para a F20, havendo uma absorção de  $8,85 \pm 0,61$  (5  $\mu\text{M}$ ) e  $17,61 \pm 0,77$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MS (15  $\mu\text{M}$ ).

A acumulação de Cr continua a ser muito superior na raiz, tal como acontece na planta jovem. Na R20, a exposição a 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cr resulta numa acumulação de  $369,78 \pm 43,13$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MS e numa acumulação bastante superior de  $1097,21 \pm 37,73$  mg  $\text{kg}^{-1}$  MS, respetivamente. A explicação para esta elevada acumulação de Cr nas raízes já foi descrita no **Capítulo IV**. Scoccianti et al. (2016) também verificaram que as folhas acumularam pequenas quantidades de Cr, enquanto as raízes e caules acumularam as maiores concentrações de crómio, tanto com um nível de exposição baixo ou elevado (10–5000  $\mu\text{M}$ ; 3, 7 dias).

Na **Figura 5.28** também estão representadas as percentagens de Cr translocado para a parte aérea de plantas de em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas contaminadas com 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cr. Na F20 exposta a 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cr, em termos percentuais, existe uma translocação de 2,0 e 0,9 % de Cr, respetivamente, em relação ao teor presente nas raízes para as mesmas concentrações. Na FV20, o comportamento é semelhante, 2,4 (5  $\mu\text{M}$ ) e 1,6 % (15  $\mu\text{M}$ ). Estes valores percentuais sugerem que a percentagem de Cr que é translocada para a parte aérea é muito baixa, tal como verificado no **Capítulo IV**, e refletem que não existe grande variação entre os valores das percentagens de Cr translocado para a parte aérea em função da concentração aplicada em solução nutritiva (5, 15  $\mu\text{M}$ ).

Na **Figura 5.29** apresentam-se as variações nas concentrações obtidas para cada elemento químico devido à presença de Cr em solução nutritiva, para a folha e raiz da planta adulta, respetivamente (os respetivos valores encontram-se na **Tabela B4** do **Anexo B**).

Na planta adulta, a exposição a 5  $\mu\text{M}$  resulta numa diminuição significativa na absorção de Ca, Mg, Mn, Cu e Zn, na F20.

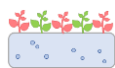


**Figura 5.29** – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F20, R20 e FV20 ao fim de 20 dias de exposição a 5 (a) e 15  $\mu$ M (b) de Cr.

Na FV20, há também uma diminuição dos mesmos elementos químicos, com a diferença de ocorrer a diminuição significativa na absorção de K, em vez de Mn. Na R20, continua a existir uma diminuição na absorção de K que é acompanhado por um aumento na absorção de Mn.

A presença de Cr afeta bastante a absorção de outros nutrientes pela planta de alface. Apesar de a quantidade de Cr acumulada na folha não ser muito elevada, a exposição a 15  $\mu$ M de Cr, resulta numa limitação significativa na absorção de todos os elementos, com exceção do K. Na FV20, há uma diminuição significativa de Na, K, Ca, e um aumento na absorção de Mn e Zn. Na R20, existe uma diminuição na absorção de Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn.





A exposição ao Cr origina (i) uma maior ou menor absorção do elemento químico pelas raízes e (ii) a sua posterior translocação para a parte aérea. Se não existem diferenças na absorção pela raiz, mas existe um efeito na parte aérea significa que a absorção pela raiz não é afetada, mas a translocação é. Este efeito observa-se, por exemplo, no caso da contaminação com 5  $\mu\text{M}$  de Cr onde existe uma diminuição no teor de Cu, Zn, Ca e Mg (F20, FV20), apesar de não existirem diferenças significativas na absorção pela raiz. O mesmo se verifica com a exposição a 15  $\mu\text{M}$  de Cr para o Mg, Cu e Fe (F20, FV20).

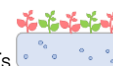
A presença de Cr leva a um aumento dos níveis de Mn e Zn, no entanto o seu efeito é bastante prejudicial para a maior parte dos outros elementos químicos estudados. O Cr devido à sua estrutura semelhante com outros elementos, pode afetar a absorção de vários elementos essenciais para a planta, tal como referido por Shanker et al. (2005). Dube et al. (2003) verificaram um aumento na concentração de Mn e uma diminuição na absorção de Fe, Zn e Cu em folhas de *Citrullus vulgaris* (50-400  $\mu\text{M}$  Cr, 28 dias). Liu et al. (2008) observaram uma diminuição na acumulação de Mn, Cu, Zn e Fe tanto em folhas como em raiz, nas plantas de *Amaranthus viridis* (1-100  $\mu\text{M}$  Cr, 20 dias).

A diminuição acentuada nos níveis de potássio e cálcio resulta em alterações na razão K/Ca e que pode ter um grande impacto no balanço hídrico, esta poderá ser uma explicação para os teores de água diminuírem, tal como verificado anteriormente, nas plantas contaminadas com crómio.

A limitação na absorção de Fe e Mg está associada ao aparecimento de cloroses e/ou degradação do sistema fotossintético, tal como observado visualmente nas plantas contaminadas com a concentração superior de crómio (**Figura 5.26**). Este comportamento também foi observado por Pandey e Sharma (2003) em que observaram alterações nos teores de Fe acumulados em plantas contaminadas com Cr (500  $\mu\text{M}$ , 8 dias), indicando que esta diminuição na absorção de Fe provoca um desequilíbrio na biossíntese de clorofila.

#### 5.4.2.2.3. Caracterização da resposta da planta adulta

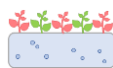
Nas **Tabelas 5.12, 5.13 e 5.14** apresentam-se os resultados obtidos para as F20, R20 e FV20, da planta adulta, respetivamente.



**Tabela 5.12** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Cr.

		F20		
	Unidade	0 μM	5 μM Cr	15 μM Cr
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	μg g <sup>-1</sup>	225,5±19,9a	271,9±45,6a	291,3±32,0a
MDA	μM g <sup>-1</sup>	0,33±0,03a	0,38±0,04a*	0,35±0,04a
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse				
clorofila a	μmol g <sup>-1</sup>	0,48±0,07a	0,50±0,03a	0,34±0,02b*
clorofila b	μmol g <sup>-1</sup>	0,12±0,02a	0,13±0,01a	0,09±0,01b
clorofila total	μmol g <sup>-1</sup>	0,60±0,09a	0,63±0,03a	0,43±0,03b*
antocianinas	μmol g <sup>-1</sup>	0,088±0,001a*	0,107±0,012ab*	0,142±0,022b*
compostos fenólicos	mg g <sup>-1</sup>	0,05±0,01a*	0,20±0,01b	0,21±0,05b
PAL	U g <sup>-1</sup>	0,29±0,02a	0,31±0,02a	0,38±0,09a
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	131,7±25,0a	157,3±10,0ab	207,7±42,6b
% RSA	%	31,0±2,3a	42,2±6,8ab	49,2±7,4b
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	129,8±12,4a	117,5±16,9a	113,7±12,5a
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,10±0,02a	0,10±0,03a	0,05±0,01b
POD	U g <sup>-1</sup>	0,36±0,02a*	0,34±0,03a*	0,20±0,02b*
APX	U g <sup>-1</sup>	1,56±0,37a	1,45±0,20a	0,77±0,03b*
GPX	U g <sup>-1</sup>	76,5±5,7a	73,8±10,0a	68,1±7,2a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,06±0,01a	0,09±0,02ab	0,12±0,02b
Metabolitos antioxidantes				
ASA	μmol g <sup>-1</sup>	1,00±0,10a	2,65±0,44b*	0,91±0,18a*
DHA	μmol g <sup>-1</sup>	0,56±0,03a*	0,55±0,04a*	0,38±0,05b*
ASC	μmol g <sup>-1</sup>	1,56±0,47ab	3,20±0,48a*	1,29±0,47b*
GSH	μmol g <sup>-1</sup>	0,73±0,09a*	0,67±0,08a*	0,50±0,07b*
GSSG	μmol g <sup>-1</sup>	0,10±0,02a*	0,14±0,03a	0,23±0,03b
TGSH	μmol g <sup>-1</sup>	0,83±0,1a*	0,81±0,1a*	0,73±0,1b*

O símbolo  $\pm$  representa o desvio padrão; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.

**Tabela 5.13** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Cr.

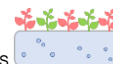
		R20		
	Unidade	0 µM	5 µM Cr	15 µM Cr
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	71,0±7,6a	66,1±21,4a	151,5±10,2b*
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,31±0,01a*	0,23±0,03b	0,34±0,03a*
Defesa Antioxidante				
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	131,1±23,5a	117,6±25,6a	160,9±13,5a*
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,048±0,004a*	0,051±0,007a*	0,066±0,003b*
POD	U g <sup>-1</sup>	3,3±1,2a	64,4±14,8b*	37,9±10,5c
APX	U g <sup>-1</sup>	1,37±0,18a	1,29±0,07a	1,45±0,12a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,067±0,004a*	0,038±0,006b	0,047±0,005b*
Metabolitos antioxidantes				
ASA	µmol g <sup>-1</sup>	0,72±0,10a	0,60±0,05a	0,76±0,03a

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.

**Tabela 5.14** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na FV20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Cr.

		FV20		
	Unidade	0 μM	5 μM Cr	15 μM Cr
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	μg g <sup>-1</sup>	562,4±67,3a	833,2±88,9b	1023,3±72,4c
MDA	μM g <sup>-1</sup>	2,34±0,48a	1,07±0,20b	1,18±0,12b
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse compostos fenólicos				
	mg g <sup>-1</sup>	0,20±0,04a	0,73±0,13b	0,36±0,07a
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	170,8±25,5a	574,8±77,5b	329,9±20,7c
% RSA	%	35,4±3,1a	85,6±0,3b	81,3±4,5b
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	43,4±382,1a	314,2±630,3a	n.d.
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,04±0,02a	0,08±0,02ab	0,14±0,03b
POD	U g <sup>-1</sup>	0,11±0,04a	0,37±0,14b	0,22±0,03ab
APX	U g <sup>-1</sup>	1,38±0,34a	1,09±0,09a	1,14±0,35a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,01±0,01a	n.d.	n.d.
Metabolitos antioxidantes				
ASA	μmol g <sup>-1</sup>	1,47±0,08a	1,94±0,38ab	2,47±0,33b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; n.d. significa não detetado; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.

*Folha nova – 5  $\mu$ M Cr (planta adulta)*

Na F20 exposta a 5  $\mu$ M não se observam diferenças significativas para os teores de  $H_2O_2$  nem de MDA, apesar de existir um ligeiro aumento dos seus teores comparativamente às plantas controlo.

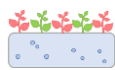
Relativamente aos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse não se observaram diferenças significativas na concentração de clorofila, antocianinas e atividade da PAL, havendo apenas um aumento significativo no teor de compostos fenólicos. Não existem diferenças significativas na atividade antioxidante total nem na atividade enzimática das enzimas antioxidantes estudadas. Isto evidencia um menor grau de stresse oxidativo na planta adulta exposta a estes tratamentos.

Relativamente aos metabolitos antioxidantes não-enzimáticos, apenas existe um aumento significativo no teor de ASA, demonstrando que este metabolito é fundamental na remoção dos níveis de peróxido de hidrogénio. Gangwar e Singh (2011) observaram um aumento no teor de ASA na parte aérea de plântulas de ervilha exposta a 50-250  $\mu$ M de Cr, ao fim de 11 dias. Sinha et al. (2005) referiram que houve um aumento no teor de ASA ao fim de 48 e 96 h de exposição a 10, 40, 80 e 160  $\mu$ M de Cr, comparativamente ao controlo nas folhas de *Pistia stratiotes*. No entanto, observaram uma diminuição do seu teor ao fim de 144 h de exposição a 80 e 160  $\mu$ M de Cr.

*Folha nova – 15  $\mu$ M Cr (planta adulta)*

A exposição de F20 a 15  $\mu$ M de Cr, não origina diferenças significativas nos teores de malondialdeído e de  $H_2O_2$ , havendo um ligeiro aumento dos seus teores comparativamente ao controlo. Gill et al. (2015a) verificaram que a exposição a 100  $\mu$ M de Cr, ao fim de 15 dias de tratamento, também não alteraram significativamente os teores de MDA e de  $H_2O_2$  em folhas de brássicas. Uma explicação possível é o facto de o  $H_2O_2$  poder originar rapidamente radicais  $HO^\bullet$ , extremamente reativos, através das reações de Fenton (Panda e Choudhury, 2005) pelo que os teores de  $H_2O_2$  presentes podem não estar diretamente relacionados com a sua formação. Outra possível explicação para estes resultados é a existência de uma resposta enzimática ou não enzimática, eficiente, que também pode influenciar o nível de  $H_2O_2$  nas células, através de ativação de enzimas que atuam neste substrato. Neste sentido, o teor das ROS formadas não é suficiente para produzir danos nas membranas.

A atividade antioxidante total aumenta de forma significativa com a exposição a esta concentração de Cr, indicando que existe a ativação da defesa antioxidante. Em plantas de

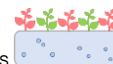


quinoa, a atividade antioxidante aumentou de forma dependente em relação ao tempo de exposição e concentração de Cr aplicada, sendo o nível máximo alcançado com a exposição a 5000  $\mu\text{M}$  ao fim de 7 dias (Scoccianti et al., 2016).

O teor de clorofila (a, b e total) diminuiu de forma significativa para 15  $\mu\text{M}$  de Cr, verificando-se também o aparecimento de cloroses. A diminuição nos teores de clorofila também foi observado em *Nymphaea alba* (Vajpayee et al., 2000), feijão-mungo (Samantary, 2002), *Ocimum tenuiflorum* (Rai et al., 2004), aipo (Scoccianti et al., 2006), trigo (Dey et al., 2009), ervilha (Tiwari et al., 2009) *Spartina argentinensis* (Redondo-Gómez et al., 2011), colza (Pesko et al., 2012) e quinoa (Scoccianti et al., 2016) quando sujeitas a diferentes concentrações de Cr. Chatterjee e Chatterjee (2000) também observaram uma diminuição na concentração de clorofila a e b em folhas de couve-flor expostas a 500  $\mu\text{M}$  de Cr. Os autores referem que esta diminuição no teor de clorofila se deve à inibição do transporte eletrônico fotossintético, interferência na produção de clorofila através da inibição direta de enzimas ou devido à deficiência em Fe e Mg. Estes resultados estão de acordo com os sintomas visíveis de toxicidade observados para folhas expostas a 15  $\mu\text{M}$  de Cr, como o aparecimento de folhas cloróticas (**Figura 5.26**) que ocorre provavelmente devido à diminuição do teor de Fe e Mg (**Figura 5.29**).

Por outro lado, existe um aumento do teor de antocianinas e de compostos fenólicos, o que indica que está a ocorrer a ativação da produção destes compostos, como resposta ao stresse induzido pela presença deste elemento. Apesar de as variações na atividade da PAL não serem significativas, existe um ligeiro aumento da sua atividade, comparativamente ao controlo. Esta alteração na produção de pigmentos, como as clorofilas e antocianinas é um dos efeitos também verificados por Boonyapookana et al. (2002) quando o tempo de exposição (3-12 dias) e concentração de crómio aumentou (19-154  $\mu\text{M}$ ).

A SOD e GPX parecem continuar a não ter influência na reposta de defesa da planta face ao stresse induzido pelo Cr. A CAT, POD e APX diminuem a sua atividade na F20 exposta a 15  $\mu\text{M}$  de Cr. Logo, a capacidade das plantas em aumentar a proteção antioxidante para combater o efeito negativo da presença de Cr parece ser limitado. Vários estudos demonstraram que a presença de Cr inativou enzimas cruciais na proteção antioxidante. Dey et al. (2009) observaram uma diminuição na atividade da SOD e CAT com o aumento da concentração de Cr (192, 962 e 1923  $\mu\text{M}$ ) em plântulas de trigo expostas durante 7 dias ao contaminante. A atividade da CAT também diminuiu em plantas de *Amaranthus viridis* L. com o aumento da concentração de Cr (1-100  $\mu\text{M}$ ) (Liu et al., 2008). A APX demonstrou ser muito sensível à presença de Cr principalmente ao fim de 3 a 5 dias exposta a 100  $\mu\text{M}$  Cr (Pandey



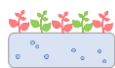
et al., 2009). Rai et al. (2004) também verificaram que a APX não foi relevante na destoxificação do  $H_2O_2$ , diminuindo a sua atividade em plantas de *Ocimum Tenuiflorum* devido à sua sensibilidade ao Cr (10, 20, 50, 100  $\mu M$ ; 24, 48, 72 horas).

A única enzima antioxidante que está envolvida no combate ao stresse oxidativo provocado por estas condições é a GR. Provavelmente, esta enzima está a originar GSH que é rapidamente convertida em GSSG, originado assim um aumento significativo desta espécie na sua forma oxidada. Esta enzima é importante na regeneração da GSH que pode contribuir para o processo de destoxificação de Cr nas folhas, evitando que ocorram danos oxidativos. Vários resultados obtidos por outros autores em ervilha (Pandey et al., 2009), colza (Zaimoglu et al., 2011) e *Brassica juncea* (Pandey et al., 2005) indicam que a GR é importante na proteção das plantas face ao stresse induzido por Cr. di Toppi et al. (2002) também verificaram que a exposição ao Cr (96, 192  $\mu M$ ) causou uma diminuição no teor de GSH em milho, tomate e couve-flor. Esta diminuição no teor de TGS e GSH acompanhado de um aumento na atividade da GR também foi observado por Shanker et al. (2004) em *Vigna radiata* L. (50  $\mu M$ , 15 dias). Qiu et al. (2013) observaram que o teor de GSH também diminuiu em plantas de arroz expostas a 100  $\mu M$  de Cr.

Outros autores obtiveram resultados que não estão de acordo com os obtidos neste estudo e indicam que a resposta antioxidante depende muito do tipo de stresse e da espécie da planta. Subrahmanyam (2008) referiu que com o aumento da concentração de Cr (100, 150, 250  $\mu M$ ; 20 dias) existiu um aumento da atividade da SOD e uma diminuição das atividades da CAT, APX e GR, indicando que estas enzimas são suscetíveis à toxicidade induzida pelo Cr. Dhir et al. (2009) verificaram que houve um aumento da atividade da CAT, GPX, APX e GR em plantas de *Salvinia natans* que foram regadas com águas residuais enriquecidas com Cr (673, 962  $\mu M$ ). Ding et al. (2016) verificaram que as enzimas antioxidantes contribuem para a tolerância ao Cr, observando um aumento na SOD, CAT e POD nas folhas e uma diminuição nas raízes em plantas de *Hibiscus cannabinus* contaminadas com Cr (500, 1000, 1500  $\mu M$ ; 4 dias).

#### *Folha velha – 5 e 15 $\mu M$ Cr (planta adulta)*

Na FV20, com a exposição a 5  $\mu M$  de Cr há um aumento significativo dos teores de peróxido de hidrogénio com o aumento da concentração de Cr testada mas os níveis de MDA diminuem significativamente, revelando que não existe peroxidação lipídica. A atividade antioxidante total aumenta significativamente, muito provavelmente devido ao aumento da atividade da POD que é a única enzima ativa na remoção eficiente dos teores de  $H_2O_2$ . Esta exposição



leva a um aumento significativo dos polifenóis totais, o que está de acordo com os resultados observados para a POD, dado que são um dos seus substratos. A atividade da SOD, CAT e APX não apresentam diferenças significativas e a GR diminui a sua atividade para esta concentração de Cr. Não se observam diferenças significativas nos teores de ASA.

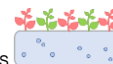
Na FV20 exposta a 15  $\mu\text{M}$  de Cr também se observa um aumento do teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com uma diminuição significativa nos teores de MDA. Vários autores têm referido que as ROS são produzidas como resultado do stresse oxidativo induzido pela presença de Cr (Panda, 2003; Pandey et al., 2009). A atividade antioxidante total aumenta de forma significativa, em parte devido ao aumento da atividade da CAT que é a única enzima ativa na remoção dos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os teores de ASA aumentam significativamente logo este metabolito antioxidante também está ativo na remoção do peróxido aliado à atividade da CAT. Apesar do aumento do peróxido de hidrogénio, o sistema está a ser eficiente uma vez que não ocorrem danos significativos nas membranas.

#### *Raiz – 5 e 15 $\mu\text{M}$ Cr (planta adulta)*

Na R20 exposta a 5  $\mu\text{M}$  não se observam diferenças significativas nos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e o teor de MDA diminui significativamente em relação ao controlo. Na defesa antioxidante, não se observaram diferenças significativas nas atividades enzimáticas da SOD, CAT, APX e a GR diminui significativamente. Também não se observaram diferenças significativas nos teores de ASA. A única enzima ativa na remoção do peróxido é a POD. A atividade desta enzima é bastante superior nas raízes relativamente às folhas. Gill et al. (2015a) também verificaram o mesmo comportamento referindo que estão a atuar mecanismos na destoxificação das ROS formadas nas raízes.

Na R20 exposta a 15  $\mu\text{M}$  de Cr, há um aumento significativo do teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , não havendo, no entanto, indícios de danos oxidativos. Uma explicação para este aumento deve-se a facto de o Cr ficar preferencialmente retido nas raízes potenciando o seu efeito nessa parte da planta. A atividade da CAT e da POD aumenta significativamente, estando estas duas enzimas envolvidas na remoção dos níveis elevados de peróxido, e por serem eficientes não ocorrem danos oxidativos. Não se observaram diferenças significativas no teor de ASA, logo este antioxidante não-enzimático não está ativo na resposta da planta. A SOD, APX e GR aparentemente não estão envolvidas no mecanismo de defesa da planta de alface face ao stresse induzido pelo Cr. É interessante observar que a atividade enzimática da GR aumenta nas folhas, mas nas raízes a presença de Cr inativa esta enzima muito provavelmente porque neste tecido a concentração de Cr é mais elevada. Esta diminuição na atividade de uma





enzima com o aumento da concentração externa de Cr está relacionada com o efeito inibitório dos íons Cr no próprio sistema enzimático (Hayat et al., 2012).

#### **5.4.2.2.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta adulta face à toxicidade induzida por Cr**

Com os resultados obtidos foi possível desenhar um esquema metabólico para a resposta da planta adulta exposta a Cr (**Figura 5.30**).

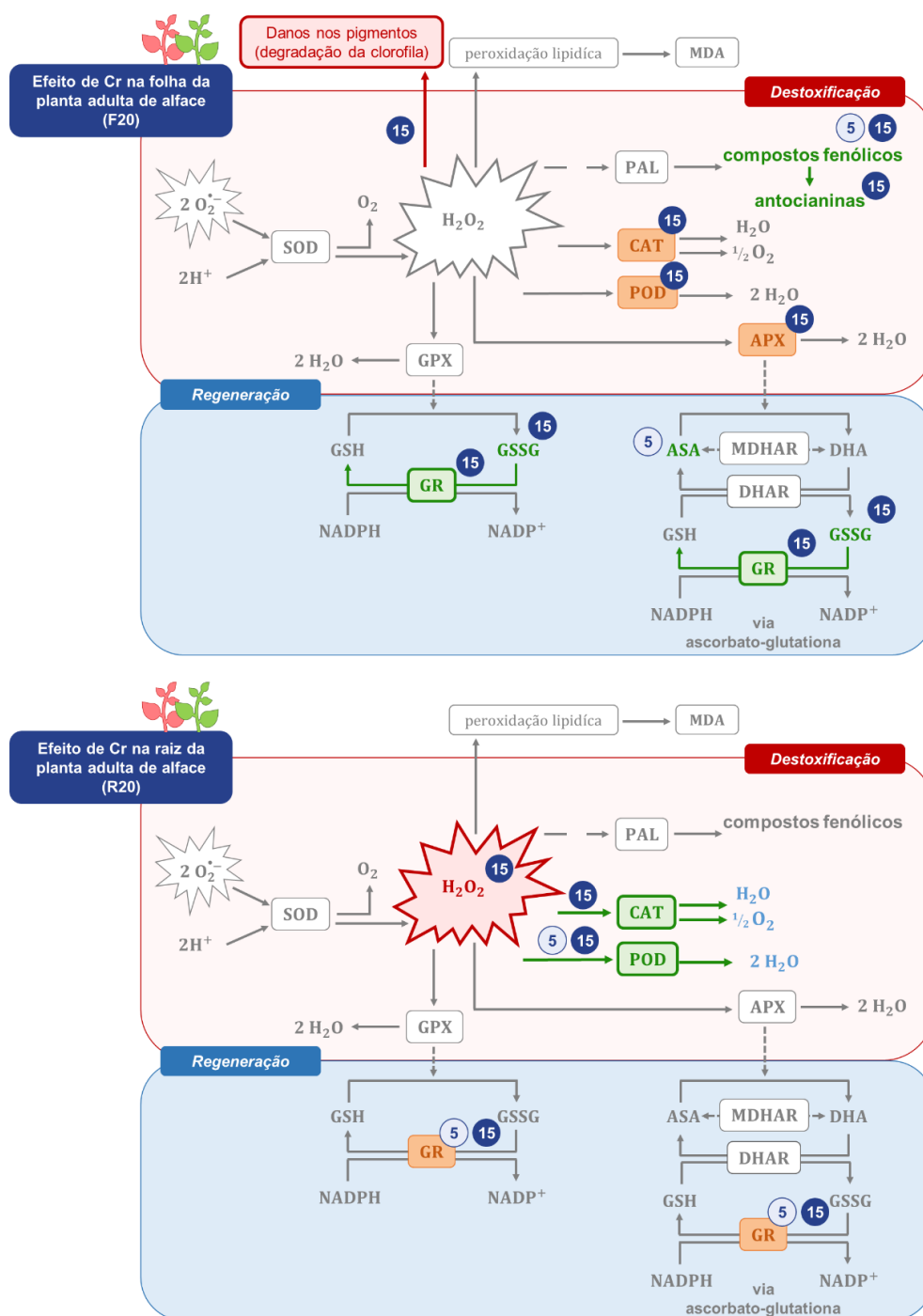
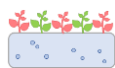
Na planta adulta, é na raiz que existe a produção significativa de peróxido de hidrogénio que tem como consequência a ativação de enzimas antioxidantes, CAT e POD, para combater o stresse induzido por este elemento, uma vez que é neste órgão que existe uma maior acumulação de Cr. Os mecanismos de defesa ativos, aparentemente, parecem ser eficientes na prevenção de ocorrência de danos, uma vez que não existe peroxidação lipídica.

Em folhas, não existe peroxidação lipídica e os níveis de peróxido de hidrogénio parecem controlados evidenciando que estes órgãos são menos afetados pela presença de Cr que as raízes. A defesa da planta é, maioritariamente, realizada através da ativação da síntese de compostos fenólicos, antocianinas, ASA e aumento da atividade enzimática da GR.

A presença de Cr tem a particularidade de inativar enzimas antioxidantes que são cruciais na resposta da planta, como a CAT, POD e APX, no entanto, aparentemente, parece não ter grande efeito porque a planta consegue sobreviver através da ativação de outros mecanismos de defesa. Existe também a ocorrência de danos nos pigmentos que poderá ser justificada pelos distúrbios verificados na absorção de nutrientes, nomeadamente a deficiência em Fe, que tem implicações na síntese de clorofila.

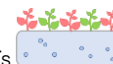
#### *Conclusões intercalares*

Na planta jovem não se observam sintomas visíveis de toxicidade tanto na parte aérea como na raiz, assim como também não se observam diferenças significativas na massa fresca da parte aérea das plantas. Na massa fresca da raiz existe uma diminuição significativa nas plantas contaminadas com 5 e 15  $\mu\text{M}$ , evidenciando que nesta fase de desenvolvimento o Cr tem maior efeito neste órgão. Os valores percentuais de diminuição da biomassa indicam que o Cr teve o maior efeito na raiz.



**Figura 5.30** – Representação esquemática da resposta antioxidante em F20 e R20 de alface M4E contaminada com 5 e 15 µM de Cr (indicado na figura como 5 e 15).

A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais. A laranja estão representados os mecanismos enzimáticos que diminuem na defesa.



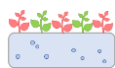
Na planta adulta, as plantas contaminadas com 5  $\mu\text{M}$  não apresentam sintomas visíveis de toxicidade, enquanto a exposição a 15  $\mu\text{M}$  origina uma diminuição no tamanho das plantas, aparecimento de folhas novas avermelhadas, cloroses nas folhas velhas e o crescimento da raiz é muito afetado, havendo o seu amarelecimento e menor formação de raízes secundárias. A massa fresca apresenta uma tendência para decrescer, observando-se apenas uma diminuição significativa na biomassa da parte aérea e raiz das plantas contaminadas com 15  $\mu\text{M}$ . Neste caso, os valores percentuais de diminuição da biomassa indicam que o Cr teve o mesmo efeito em ambos os órgãos.

O Cr interfere na absorção de água, tanto na planta jovem como adulta, indicando que isto pode estar relacionado com a diminuição do crescimento da raiz que tem por consequência uma diminuição na absorção de água e no seu transporte para a parte aérea.

A acumulação de Cr ocorre de forma preferencial na raiz e esta tendência é comum para os dois estados de desenvolvimento da planta, verificando-se que este elemento é pouco móvel na planta como se pode verificar através dos valores percentuais baixos de translocação para a parte aérea obtidos no presente trabalho.

Em relação ao Cr dado que não existe legislação em vigor para o limite máximo permitido em hortícolas de folha, são apenas interpretados os valores obtidos comparativamente com os níveis normais de Cr presentes em plantas. Segundo Nagajyoti et al. (2010), estes valores variam entre 0,2-1,0 mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MS. Em folhas há uma acumulação de  $5,24 \pm 0,09$  e de  $8,27 \pm 1,10$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MS, após 2 dias de exposição a 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cr, respetivamente. Em folhas, na planta adulta, essa acumulação é de  $7,21 \pm 0,30$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MS (5  $\mu\text{M}$ ) e de  $10,05 \pm 1,02$  mg de Cr  $\text{kg}^{-1}$  MS (15  $\mu\text{M}$ ). Todas as plantas contaminadas com Cr, neste estudo ultrapassaram os valores normais presentes em plantas não contaminadas. Em folhas, as quantidades de Cr acumuladas na planta adulta são muito semelhantes às quantidades acumuladas pela planta jovem, reforçando a ideia que este elemento fica retido principalmente nas raízes.

Para além da raiz ser o órgão que está em contacto direto com o contaminante, a entrada de Cr nas plantas apresenta os mesmos transportadores que outros elementos essenciais, podendo indicar uma dificuldade por parte da planta em conseguir distinguir os contaminantes dos nutrientes. Na planta jovem, a presença de Cr afeta pouco a absorção de diferentes elementos químicos ( $\downarrow\text{K}$ ,  $\uparrow\text{Fe}$ ), no entanto na planta adulta, uma maior acumulação de Cr desencadeia um desequilíbrio bastante evidente na absorção de todos os diferentes nutrientes ( $\uparrow\text{Mn}$ ,  $\text{Zn}$ ;  $\downarrow\text{K}$ ,  $\text{Na}$ ,  $\text{Ca}$ ,  $\text{Fe}$ ,  $\text{Mg}$ ,  $\text{Mn}$ ,  $\text{Cu}$ ,  $\text{Zn}$ ).



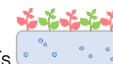
Em folhas novas, apesar de o estado de desenvolvimento da planta, a quantidade de Cr absorvida pela planta jovem e adulta é muito semelhante. É interessante verificar que na planta jovem, 2 dias são suficientes para induzir uma resposta ligeiramente mais pronunciada que na planta adulta. Em F2 contaminadas com 5  $\mu\text{M}$  há a síntese de compostos fenólicos e produção de GSH, enquanto com a exposição a 15  $\mu\text{M}$ , existe a síntese de antocianinas, aumento da atividade da POD, GR e produção de GSH. Para ambas as contaminações, e apesar de os níveis baixos de Cr presentes em folhas, os mecanismos de defesa parecem ser eficientes no controlo do stresse oxidativo, uma vez que não se verificam efeitos adversos nem aumento dos teores de MDA e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Na planta adulta, a concentração e os tempos de exposição testados neste trabalho, aparentemente, não são suficientes para induzir uma resposta metabólica mais intensa em folhas novas, uma vez que apenas uma pequena parte do Cr absorvido é efetivamente translocado para a parte aérea. Em F20, também não se observam diferenças significativas nos indicadores de stresse oxidativo (MDA e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), havendo a ativação de diferentes mecanismos nas plantas contaminadas com 5  $\mu\text{M}$  (compostos fenólicos, ASA) ou 15  $\mu\text{M}$  (compostos fenólicos, antocianinas, GR). Nesta contaminação mais elevada, já se observam danos nos pigmentos, que também se verificam visualmente através do aparecimento de cloroses e que, provavelmente, está relacionada com os distúrbios verificados na absorção dos diferentes elementos essenciais na raiz.

Em folhas velhas, apesar de existir um aumento nos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , não existem danos oxidativos indicando que os mecanismos ativos no combate ao stresse induzido pela presença de 5  $\mu\text{M}$  (compostos fenólicos, CAT, POD, APX) e 15  $\mu\text{M}$  (compostos fenólicos, POD, APX, ASA), parecem ser eficientes.

As plantas de alface toleram níveis elevados de Cr nas raízes e muito, provavelmente, este elemento fica retido na raiz na forma de quelatos ou nas paredes celulares, sendo posteriormente armazenado nos vacúolos. Por estes motivos, na planta jovem, uma concentração baixa de Cr (5  $\mu\text{M}$ ) não demonstra ativar mecanismos metabólicos de defesa. Pelo contrário, com a exposição a uma concentração superior (15  $\mu\text{M}$ ) existe a ativação o aumento da atividade da POD, mas que não é suficiente para evitar peroxidação lipídica.

Na planta adulta, a exposição a 5  $\mu\text{M}$  continua a não provocar efeitos adversos na raiz, provavelmente devido à sua quelatação nas raízes, mas neste caso, devido a um período mais prolongado de stresse já existe um aumento da POD que deve ajudar a controlar os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A exposição a 15  $\mu\text{M}$  leva ao aumento dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , evidenciando a



ocorrência de stresse oxidativo, mas sem ocorrência de peroxidação lipídica, havendo um aumento na atividade da CAT e POD.

No presente estudo é possível verificar que as plantas de alface que crescem em condições de stresse induzido pelo crómio ativam mecanismos de defesa, através de vários processos metabólicos, para se protegerem da toxicidade induzida pela presença de Cr. Os resultados indicam que existe um maior grau de stresse oxidativo nas raízes das plantas de alface contaminadas com Cr, comparativamente às folhas, nestas condições de ensaio. Apesar de os níveis baixos de Cr acumulados em folhas, o comportamento observado evidencia uma resposta efetiva da planta face à presença deste elemento, sendo relevante referir que a presença de diferentes concentrações de crómio permite ativar diferentes mecanismos de resposta conforme o estado de desenvolvimento da planta.

### 5.4.3. Chumbo

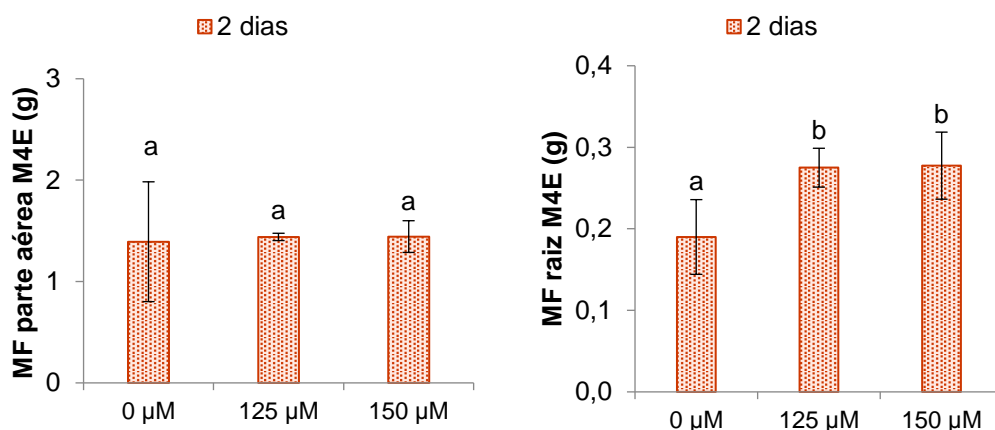
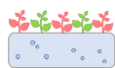
#### 5.4.3.1. Planta jovem

##### 5.4.3.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Pb

Na **Figura 5.31** apresentam-se as fotografias obtidas para as diferentes modalidades (controlo, 125 e 150  $\mu$ M), após 2 dias de contaminação com Pb para as plantas jovens de alface. Na **Figura 5.32** encontram-se os resultados obtidos para a massa fresca, da parte aérea e da raiz, da planta jovem.



**Figura 5.31** – Registo fotográfico da planta jovem de alface M4E ao 2º dia de exposição com Pb.



**Figura 5.32** – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas jovens de alface M4E ao fim de 2 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 125 e 150 µM de Pb.

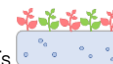
As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).

Na planta jovem não se verificam sintomas visíveis de toxicidade para nenhuma contaminação com chumbo, tanto na parte aérea como na raiz, indicando que este nível de contaminação (125, 150 µM) durante este período de tempo (2 dias de contaminação) não é suficiente para que se observem visualmente efeitos tóxicos nas plantas jovens de alface.

Este comportamento é comprovado pelos resultados obtidos para a massa fresca da parte aérea onde não se verificam diferenças significativas entre as plantas controle e as plantas contaminadas com chumbo.

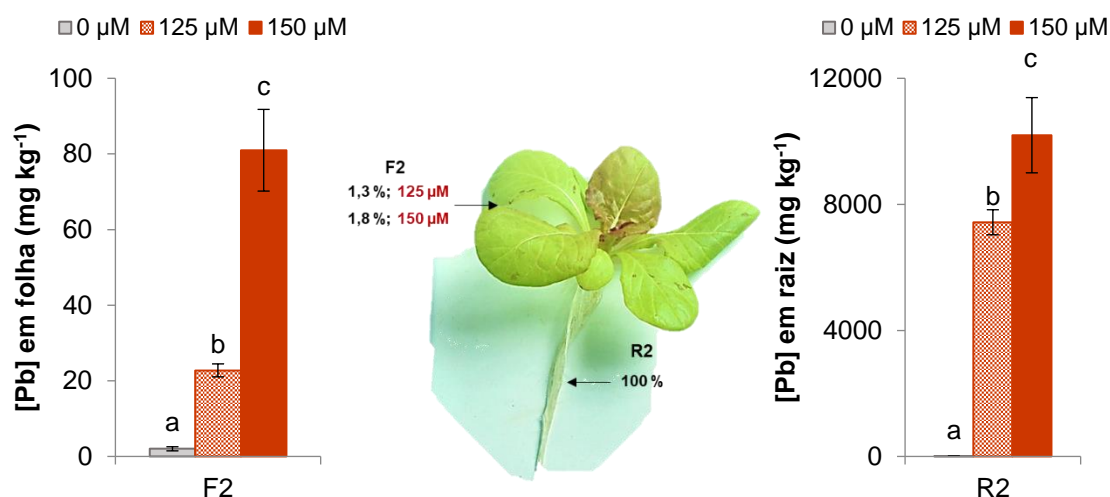
A massa fresca da raiz aumenta de forma significativa nas plantas contaminadas com 125 e 150 µM, em relação às plantas controle. Apesar de o Pb não ser um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas, este estímulo no crescimento da biomassa da raiz também já tinha sido referido e discutido no **Capítulo IV**.

Verifica-se que existe uma diminuição no teor de água das plantas controle (parte aérea: 90,6 %; raiz: 89,4 %) em relação às plantas contaminadas com 125 µM (parte aérea: 74,8 % e raiz: 89,2 %), sendo essa diminuição superior para a contaminação com 150 µM (parte aérea: 78,2 % e raiz: 86,7 %). A presença de Pb, possivelmente, interfere ligeiramente com a absorção de água pela planta, sendo essa interferência maior nos teores de água presentes na parte aérea. Estes resultados estão concordantes com os resultados obtidos para a biomassa, uma vez que existe um estímulo na biomassa da raiz e daí a presença de Pb não interferir muito com os níveis de água presentes neste órgão.



#### 5.4.3.1.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos

Na **Figura 5.33** apresentam-se os resultados obtidos para a acumulação de Pb, em folha e raiz, na planta jovem.



**Figura 5.33** – Concentração de Pb em folha e raiz de plantas jovens de M4E ao fim de 2 dias de exposição a 125 e 150 µM de Pb.

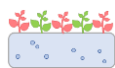
As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ). Os valores indicados correspondem às percentagens de Pb nas folhas em relação à quantidade na raiz (considerada como 100 %).

Na planta jovem ocorre uma acumulação crescente de Pb nos diferentes órgãos da planta com o aumento das concentrações de Pb em solução nutritiva.

A acumulação de Pb ocorre de forma preferencial na raiz jovem. A exposição a 125 e 150 µM de Pb resulta numa acumulação significativamente superior de 7431,57±397,61 e 10194,06±1194,34 mg de Pb kg<sup>-1</sup> MS, respetivamente. A explicação para este aumento do teor de Pb nas raízes já foi descrita no **Capítulo IV**. A F2 acumula 22,75±1,71 e 80,98±10,80 mg de Pb kg<sup>-1</sup> MS, quando exposta a 125 e 150 µM de Pb, respetivamente. Apesar de se não verificarem efeitos visíveis de toxicidade (**Figura 5.10**), a planta jovem de alface parece tolerar níveis relativamente elevados de Pb nos seus órgãos, principalmente na raiz.

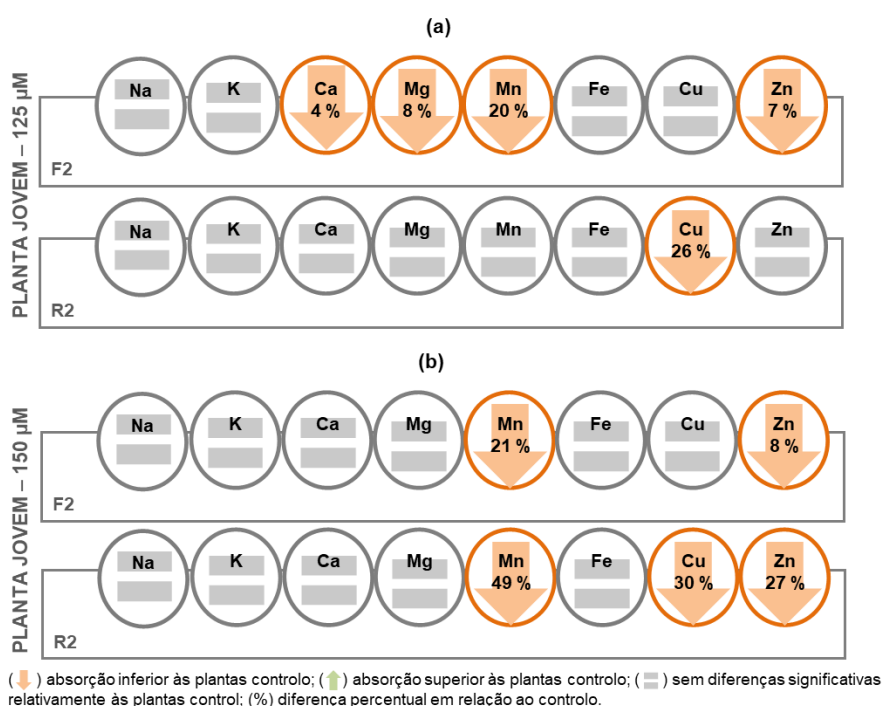
Na **Figura 5.33** também se apresentam as percentagens de Pb acumulado na parte aérea em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas jovens contaminadas com 125 e 150 µM de Pb.





A quantidade de Pb translocada para a F2 é de 1,3 % e 1,8 % em folhas expostas a 125 e 150  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Com a exposição a Pb durante 2 dias estes valores percentuais mantêm-se constantes para as duas concentrações de chumbo em solução nutritiva, tal como verificado no **Capítulo IV**. Estes resultados indicam que apenas uma pequena quantidade de Pb é translocada para a parte aérea da planta jovem, provavelmente porque o Pb é um elemento não essencial, tendo mais dificuldade em mover-se na planta.

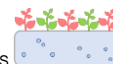
Na **Figura 5.34** apresentam-se as principais tendências observadas na variação dos teores dos elementos químicos devido à presença de Pb em solução nutritiva, para a folha e raiz da planta jovem (os respetivos valores encontram-se na **Tabela B5**).



**Figura 5.34** – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F2 e R2 ao fim de 2 dias de exposição a 125 (a) e 150  $\mu\text{M}$  (b) de Pb.

É possível verificar que a exposição a 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb influencia significativamente a absorção de alguns dos elementos químicos, sempre no sentido de uma diminuição.

A contaminação com 125  $\mu\text{M}$  de Pb resulta na restrição de absorção de Ca, Mg, Mn e Zn em F2, mas não na raiz. Este nível de contaminação de Pb afeta principalmente a translocação desses elementos para a parte aérea da planta. Na R2 uma contaminação de 125  $\mu\text{M}$  de Pb afeta negativamente apenas a acumulação de Cu.



Na F2 expostas a 150  $\mu\text{M}$  de Pb ocorre uma limitação na absorção de Mn e Zn. Na R2, para além desses dois elementos ocorre também a diminuição da absorção de Cu, tal como se verifica para a exposição a 125  $\mu\text{M}$  de Pb.

A exposição ao Pb diminui a concentração de cátions divalentes como o Zn, Mg, Ca, Cu e Mn, provavelmente por terem semelhanças estruturais. Esta diminuição na absorção de nutrientes na presença de Pb resulta da competição pela entrada na planta e pode estar também relacionada com o bloqueio da absorção pela raiz, diminuição da translocação das raízes para a parte aérea ou uma alteração na distribuição destes elementos na planta.

#### 5.4.3.1.3. Caracterização da resposta da planta jovem

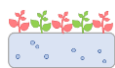
Na **Tabela 5.15** estão os resultados obtidos para os parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Pb.

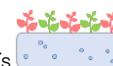
##### *Folha nova – 125 $\mu\text{M}$ Pb (planta jovem)*

Na F2 exposta a 125  $\mu\text{M}$  de Pb não se observam diferenças significativas nos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , apesar de haver um ligeiro aumento da sua concentração comparativamente ao controlo. Este facto pode estar relacionado com a existência de mecanismos de resposta responsáveis pela degradação e/ou eliminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou outros tipos de ROS formados. Os teores de MDA aumentam embora de forma não significativa, indicando a não ocorrência de danos oxidativos.

Relativamente aos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse não se observam diferenças significativas nos teores de clorofilas, antocianinas, compostos fenólicos e atividade da PAL. Com a contaminação de 125  $\mu\text{M}$  de Pb também não se observam diferenças significativas na atividade antioxidante total, indicando um menor grau de stresse oxidativo nas folhas novas das plantas sujeitas a este tratamento.

Isto é comprovado pela não observação de diferenças significativas na atividade enzimática da maior parte das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX, GPX, GR). A POD é a única que apresenta um aumento significativo sugerindo que esta enzima está ativa na conversão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água. Vários autores também referiram que a exposição a Pb levou à indução significativa da atividade da POD (Gopal e Rizvi, 2008; MacFarlane e Burchett, 2001; Zhang et al., 2007).

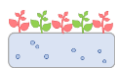




**Tabela 5.15** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Pb.

	Unidade	F2		
		0 μM	125 μM Pb	150 μM Pb
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	μg g <sup>-1</sup>	289,9±48,1a	378,9±52,0a	380,7±39,0a
MDA	μM g <sup>-1</sup>	0,28±0,06a	0,44±0,08a	0,37±0,04a
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse				
clorofila a	μmol g <sup>-1</sup>	0,38±0,04a	0,40±0,03a	0,38±0,05a
clorofila b	μmol g <sup>-1</sup>	0,09±0,01a	0,10±0,01a	0,09±0,01a
clorofila total	μmol g <sup>-1</sup>	0,43±0,05a	0,50±0,04a	0,47±0,06a
antocianinas	μmol g <sup>-1</sup>	0,054±0,003a	0,046±0,006a	0,110±0,022b
compostos fenólicos	mg g <sup>-1</sup>	0,18±0,03a	0,13±0,05a	0,24±0,07a
PAL	U g <sup>-1</sup>	0,29±0,01a	0,26±0,02a	0,49±0,05b
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	158,2±29,3ab	129,4±15,8a	219,5±38,6b
% RSA	%	38,2±1,6ab	36,6±2,6a	50,7±8,3b
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	86,0±13,2a	94,7±17,2a	100,7±21,9a
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,09±0,03a	0,13±0,04ab	0,19±0,01b
POD	U g <sup>-1</sup>	0,23±0,03a	0,39±0,06b	0,31±0,05ab
APX	U g <sup>-1</sup>	0,88±0,21a	0,86±0,18a	0,68±0,14a
GPX	U g <sup>-1</sup>	65,9±3,6a	82,9±13,3a	72,6±10,3a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,06±0,02a	0,10±0,01a	0,10±0,02a
Metabolitos antioxidantes				
ASA	μmol g <sup>-1</sup>	1,10±0,08a	1,30±0,22a	1,36±0,06a
DHA	μmol g <sup>-1</sup>	0,94±0,06ab	0,53±0,23a	1,06±0,25b
ASC	μmol g <sup>-1</sup>	2,04±0,31a	1,83±0,11b	2,42±0,05b
GSH	μmol g <sup>-1</sup>	0,4±0,1a	1,2±0,3b	0,7±0,2a
GSSG	μmol g <sup>-1</sup>	0,25±0,02a	0,43±0,13b	0,14±0,03a
TGSH	μmol g <sup>-1</sup>	0,65±0,1a	1,63±0,1b	0,84±0,2c

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controlo.



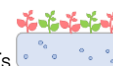
Relativamente aos metabolitos antioxidantes não-enzimáticos, não se observam diferenças significativas nos teores de ASA. Por outro lado, existe um aumento significativo no teor de GSH evidenciando que este metabolito antioxidante está ativo na eliminação de  $H_2O_2$ . No entanto, estes mecanismos de defesa não estão a ser suficientes para evitar a formação de danos oxidativos, tal como indicam os teores de MDA obtidos.

*Folha nova – 150  $\mu M$  Pb (planta jovem)*

Na F2 contaminada com 150  $\mu M$  de Pb não se observam diferenças significativas no teor de  $H_2O_2$  havendo, no entanto, um ligeiro aumento em relação ao controlo. Este facto pode estar relacionado com a existência de uma resposta enzimática ou não enzimática, eficiente, que pode influenciar o nível de  $H_2O_2$  nas células. Existe uma tendência crescente de aumento do teor de MDA, apesar de não se verificarem diferenças significativas o que sugere que a defesa antioxidante da planta poderá estar a ser eficiente e por isso, não se observam danos oxidativos.

Nos teores de clorofilas (a, b e total) não se observam diferenças significativas, o que está de acordo com os resultados obtidos visualmente (**Figura 5.31**). Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse apenas ocorre um aumento significativo na atividade da PAL e nos teores de antocianinas, apesar de em 2 dias não ser possível observar visualmente um aumento dos metabolitos obtidos por estas vias (**Figura 5.35**). Kumar et al. (2012a) sugeriram que a síntese de antocianinas é uma estratégia das plantas contra a produção das ROS devido ao stresse induzido por Pb. Os autores verificaram que concentrações mais baixas (205-750  $\mu M$ ) estimularam a síntese de antocianinas, ao contrário da exposição a concentrações mais elevadas de Pb (1000 e 1250  $\mu M$ ). Os autores também referiram que houve uma estimulação na atividade da PAL, que resultou neste aumento nos teores de antocianinas.

Na defesa antioxidante enzimática, a CAT é a única enzima que apresenta um aumento da sua atividade com a exposição a 150  $\mu M$  de Pb. Uma explicação possível é que a CAT atua principalmente em situações em que as concentrações de  $H_2O_2$  são elevadas (Mittler, 2002). Esta enzima está ativa nas folhas novas contaminadas com uma concentração de chumbo superior (150  $\mu M$ ) onde, supostamente, existe uma intensidade de stresse maior. Por outro lado, não se observam diferenças significativas na atividade da SOD, POD, APX, GPX e GR, bem como nos teores de ASA e GSH, sugerindo que estas enzimas e metabolitos antioxidantes não-enzimáticos não estão ativos nos mecanismos de destoxificação, nestas condições.



Na **Tabela 5.16** estão os resultados obtidos para os parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Pb.

**Tabela 5.16** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Pb.

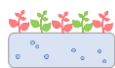
		R2		
	Unidade	0 μM	125 μM Pb	150 μM Pb
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	μg g <sup>-1</sup>	96,1±4,6a	72,7±7,6b	64,3±12,6b
MDA	μM g <sup>-1</sup>	0,30±0,05a	0,28±0,04a	0,33±0,07a
Defesa Antioxidante				
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	187,4±18,9a	112,3±14,4b	119,2±7,0b
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,045±0,006a	0,093±0,002b	0,060±0,004c
POD	U g <sup>-1</sup>	2,72±0,11a	3,20±0,18b	2,56±0,17a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,032±0,006ab	0,038±0,001a	0,024±0,003b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controlo.

#### *Raiz – 125 e 150 $\mu\text{M}$ Pb (planta jovem)*

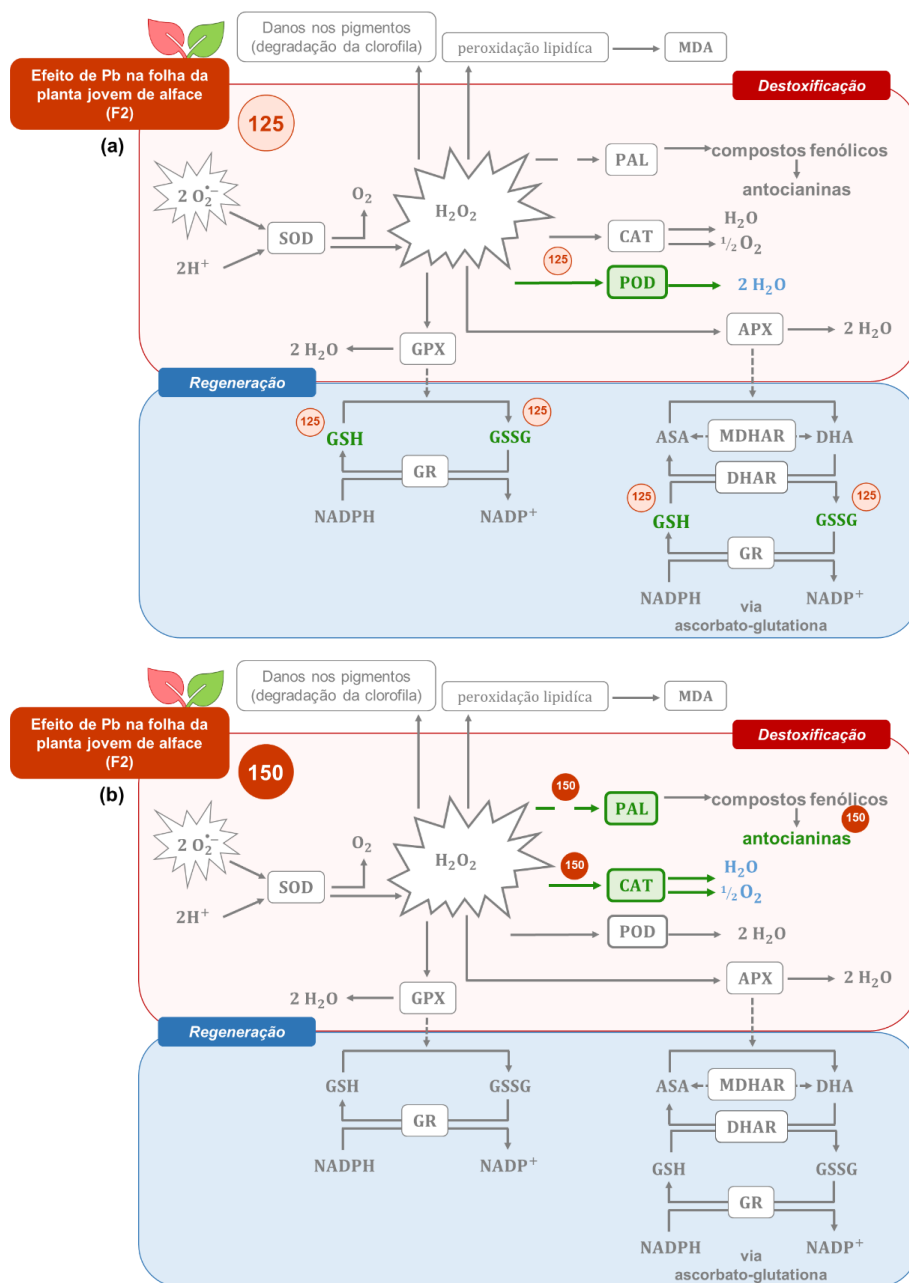
Na R2 não se observam diferenças significativas nos teores de MDA e os níveis de peróxido diminuem com o aumento da concentração de Pb, indicando a existência de enzimas e/ou metabolitos antioxidantes que atuam neste substrato, diminuindo o seu nível nas células e evitando a peroxidação lipídica. A exposição a 125  $\mu\text{M}$  de Pb resulta num aumento da atividade da CAT e da POD, comparativamente ao controlo. Este comportamento sugere que estas enzimas estão ativas na remoção dos teores de peróxido e daí a diminuição da sua concentração. A diminuição da atividade da SOD em plantas expostas a Pb, pode indicar que possivelmente todo o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> foi rapidamente convertido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> devido ao *oxidative burst* que conduziu a uma rápida acumulação destas espécies, e que posteriormente foi removido pela atividade da CAT e POD.

A exposição com 150  $\mu\text{M}$  de Pb resulta num aumento da atividade da CAT, comparativamente ao controlo. Este comportamento sugere que esta enzima é a única enzima ativa na remoção dos teores de peróxido, tal como ocorre para a F2. A SOD, POD e GR não estão ativas na defesa da planta face ao stresse oxidativo resultante das condições em teste, havendo inclusivamente uma inativação da SOD e GR devido à presença de Pb.



#### 5.4.3.1.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta jovem face à toxicidade induzida por Pb

Na planta jovem, a avaliação da resposta antioxidante de plantas expostas a Pb está representada para a folha na **Figura 5.35**.



**Figura 5.35** – Representação esquemática da resposta antioxidante em F2 de alfaca M4E contaminada com Pb. Nos esquemas estão representadas as vias ou compostos que são ativos para 125 (a) e 150 µM (b) de Pb (indicado na figura como 125 e 150).

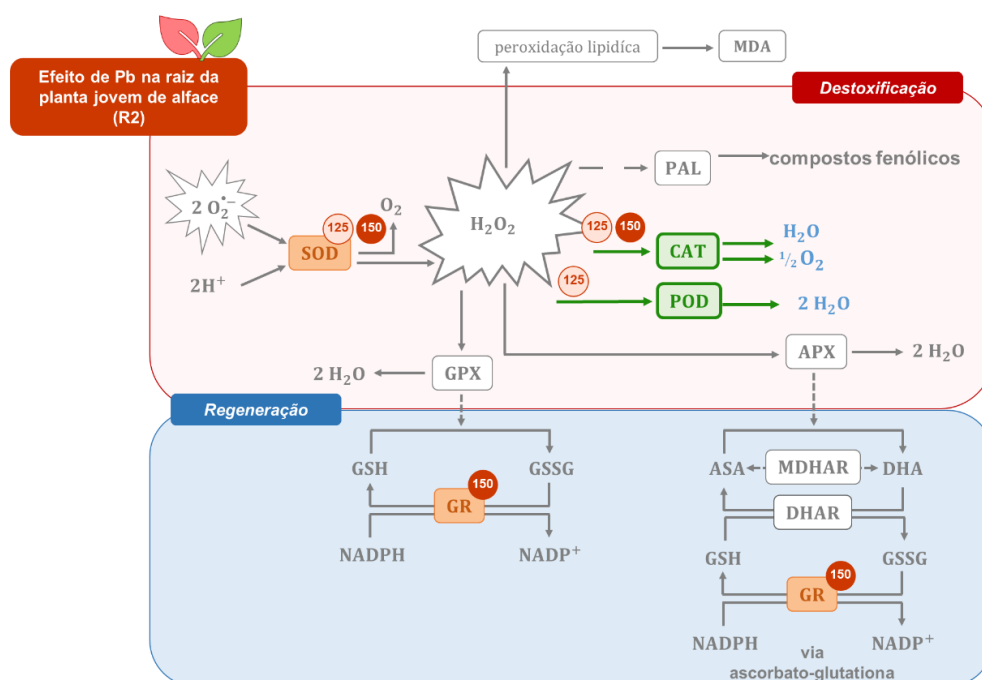
A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais.





Apesar de o Pb se acumular maioritariamente na raiz, parte do Pb que é translocado e acumulado na parte aérea induz uma resposta eficiente na folha nova face à toxicidade induzida por este elemento. A presença de diferentes concentrações de Pb aplicadas em solução nutritiva permite ativar diferentes mecanismos. Uma concentração menor ativa a POD e a formação de GSH, enquanto que na presença de uma maior concentração a destoxificação é realizada pela CAT e pela síntese de antocianinas. Este comportamento indica que a capacidade de resposta da planta difere consoante a intensidade do stresse aplicado.

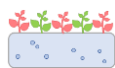
Na planta jovem, a avaliação da resposta antioxidante de plantas expostas a Pb está representada para a raiz na **Figuras 5.36**.



**Figura 5.36** – Representação esquemática da resposta antioxidante em R2 de alface M4E contaminada com 125 e 150  $\mu\text{M}$  Pb (indicado na figura como 125 e 150).

A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais. A laranja estão representados os mecanismos enzimáticos que diminuem na defesa.

Na raiz estão ativas a CAT e POD sendo responsáveis pela eliminação do peróxido em excesso que é produzido devido às quantidades elevadas de Pb absorvidas por este órgão, o que previne a ocorrência de danos oxidativos. Para além disso, provavelmente, parte do chumbo absorvido em excesso pela raiz encontra-se ligado às paredes celulares ou a

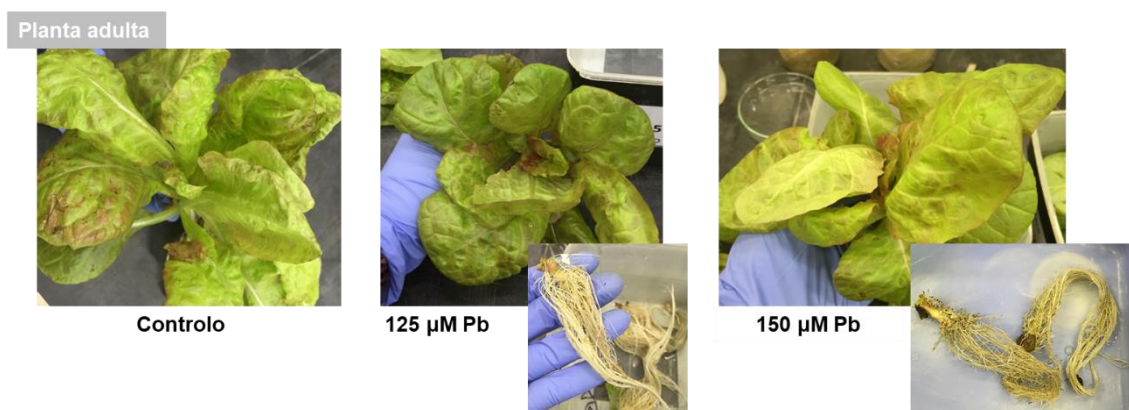


quelatos na raiz, sendo posteriormente armazenado em vacúolos, o que também previne que exista Pb disponível para provocar danos.

#### 5.4.3.2. Planta adulta

##### 5.4.3.2.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Pb

Na **Figura 5.37** apresenta-se o registo fotográfico para as plantas adultas de alface expostas às diferentes modalidades após 20 dias de contaminação com Pb.

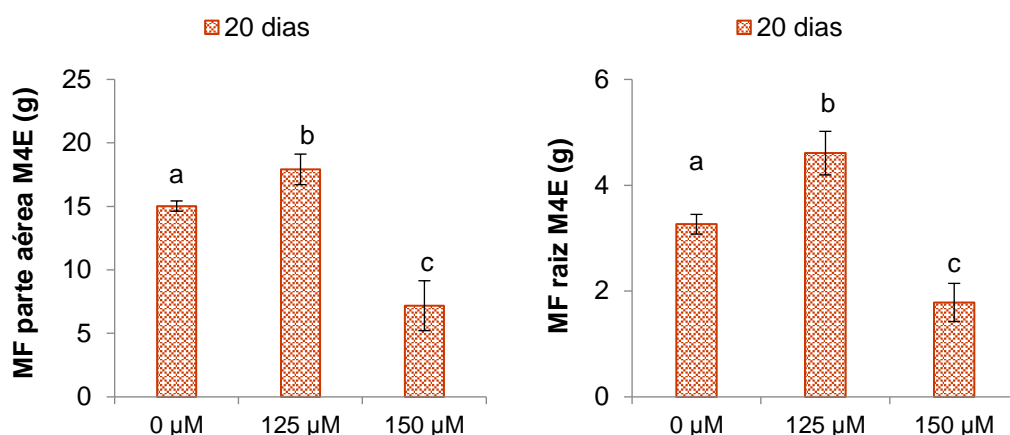


**Figura 5.37** – Registo fotográfico da planta adulta de alface M4E ao 20º dia de exposição com Pb.

Nas plantas contaminadas com 125 µM, não se observam visualmente grandes diferenças na parte aérea, em relação às plantas controlo. Na parte aérea das plantas adultas contaminadas com 150 µM Pb, apenas se verifica uma ligeira diminuição no tamanho da planta e o aparecimento de ligeiras cloroses nas F20, em relação às plantas não contaminadas.

A raiz é bastante afetada com a presença de chumbo, observando-se um crescimento atrofiado deste órgão, assim como um amarelecimento e pontos negros nas extremidades, sendo estes efeitos observados para ambas as concentrações de chumbo aplicadas, mas muito mais pronunciados para a contaminação com 150 µM de Pb.

Na **Figura 5.38** apresentam-se os resultados obtidos para a massa fresca, da parte aérea e da raiz, da planta adulta.



**Figura 5.38** – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas adultas de alface M4E ao fim de 20 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 125 e 150 µM de Pb.

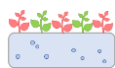
As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).

Os sintomas visíveis de toxicidade observados estão de acordo com a diminuição verificada na massa fresca da parte aérea e da raiz das plantas contaminadas com 150 µM. Esta diminuição do crescimento da planta devido à exposição a elevadas doses de Pb foi também descrita por outros autores (Gopal e Rizvi, 2008; Kopittke et al., 2007a; Piotrowska et al., 2009).

No entanto, há um aumento significativo da massa fresca da parte aérea e da raiz em plantas contaminadas com 125 µM, esta estimulação do crescimento da planta de alface M4E exposta a Pb já tinha sido verificada no **Capítulo IV**. Maldonado-Magaña et al. (2011) verificaram que a exposição a 1207 e 2413 µM de Pb estimulou o crescimento de *Acacia farnesiana*, comparativamente às plantas controle, ao fim de 60 dias de exposição.

Através da observação dos gráficos é possível verificar que tanto a parte aérea como a raiz são bastante afetadas em termos de biomassa para a contaminação de 150 µM aplicada. Se se calcular os valores relativos às diferenças percentuais da biomassa da parte aérea e raiz, relativamente às plantas controle, é possível verificar que há uma diminuição de 52,2 % na parte aérea e de 45,3 %, na raiz. Com a exposição a 125 µM, verifica-se um comportamento diferente, uma estimulação no crescimento da planta que se traduz num aumento de 19,3 % e de 41,2 %, para a parte aérea e raiz, respetivamente.

Os valores médios das percentagens de humidade também foram calculados para a biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controle, considerando-se a exposição ao fim

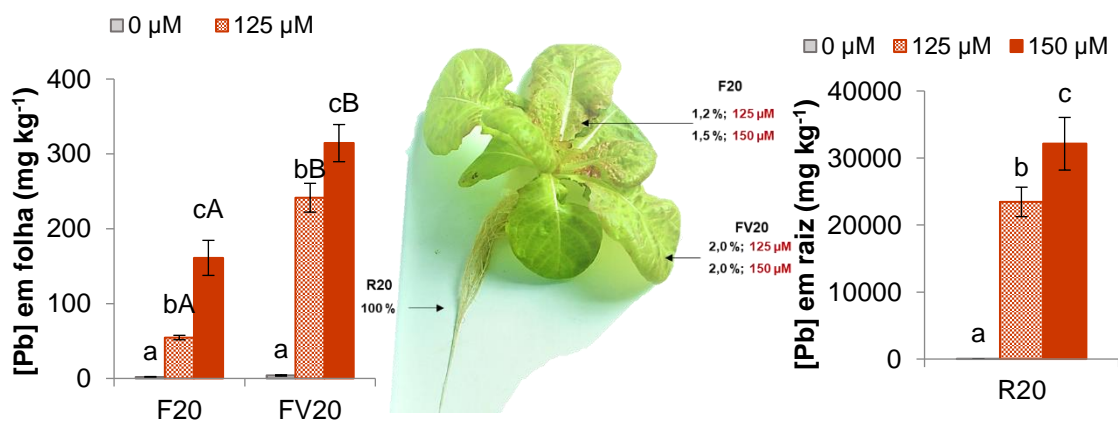


de 20 dias com 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb. Verifica-se que praticamente não existe diminuição no teor de água das plantas controle (parte aérea: 97,9 %; raiz: 91,3 %) em relação às plantas contaminadas com 125  $\mu\text{M}$  (parte aérea: 97,7 %; raiz: 90,2 %). No entanto, a exposição a 150  $\mu\text{M}$  provoca uma diminuição acentuada no teor de água (parte aérea: 45,7 %; raiz: 61,9 %).

Estes valores estão concordantes com os resultados obtidos para a massa fresca e sintomas visíveis observados. Com a exposição a 125  $\mu\text{M}$  há um estímulo do crescimento da planta, apesar dos sintomas visíveis observados, não existindo interferência com os teores de água absorvidos. Nas plantas expostas a uma concentração superior de chumbo ocorre um desenvolvimento atrofiado da raiz indicando que, provavelmente, este elemento pode interferir com a absorção de água pela raiz e com o seu posterior, transporte para a parte aérea e, por isso, afetar também o crescimento da planta.

#### 5.4.3.2.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos

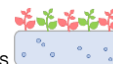
Na **Figura 5.39** apresentam-se os resultados obtidos para a acumulação de Pb, na folha e na raiz, da planta adulta.



**Figura 5.39** – Concentração de Pb em folhas e raiz de plantas adultas de M4E ao fim de 20 dias de exposição a 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ). As letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre F20 e FV20. Os valores indicados correspondem às percentagens de Pb nas folhas em relação à quantidade na raiz (considerada como 100 %).

Quanto maior a quantidade de Pb em solução nutritiva, maior a quantidade deste elemento que é acumulada nos diferentes órgãos da planta. Porém, é interessante que apesar dos



níveis de Pb acumulados na parte aérea, não se observam sintomas de toxicidade, não refletindo diretamente o nível de acumulação de Pb na planta adulta. Pelo contrário, a raiz é o órgão que acumula uma maior quantidade de Pb e que visualmente é mais afetada (**Figura 5.37**). Parte do chumbo acumulado deve, possivelmente, ficar retido nas paredes celulares ou ligado a quelatos, sendo posteriormente armazenado em vacúolos. No entanto, os sintomas visíveis de toxicidade e os valores excessivamente elevados acumulados (muito superior a todos os outros EPTs) indicam que o excesso de Pb presente poderá não estar a ser neutralizado.

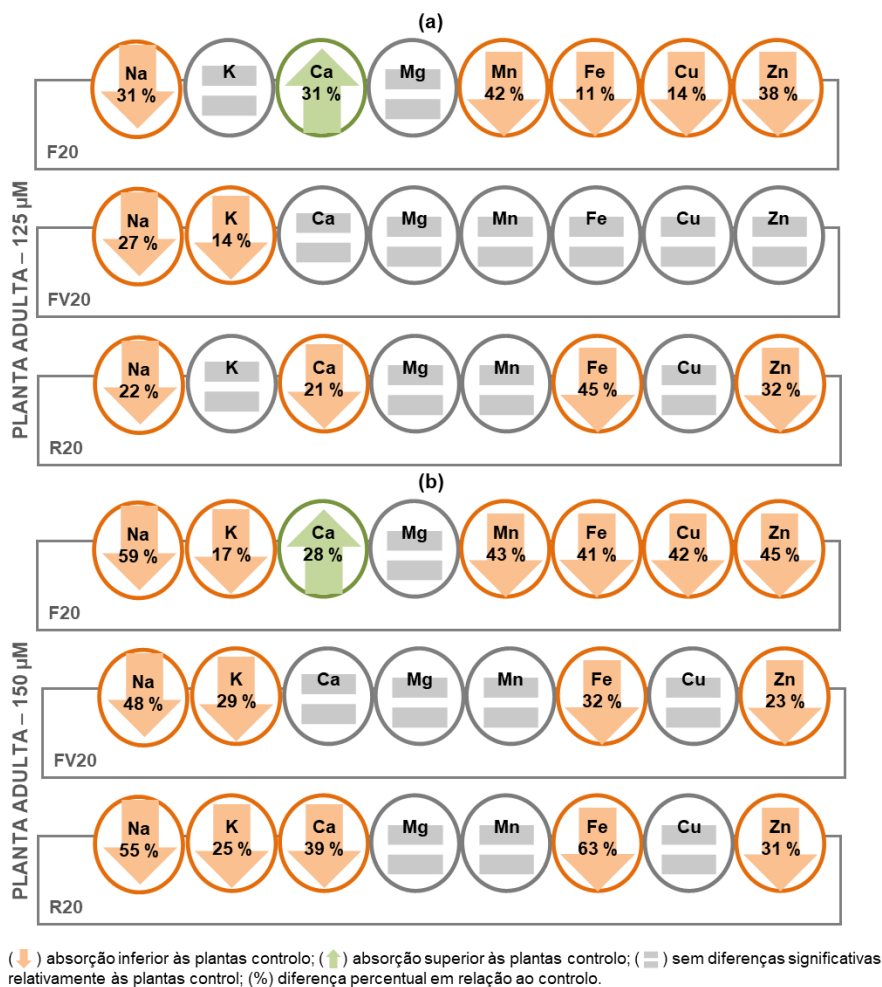
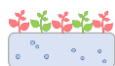
A F20 acumula  $54,65 \pm 2,95$  e  $161,07 \pm 23,41$  mg de Pb  $\text{kg}^{-1}$  MS, quando exposta a 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb, respetivamente. A quantidade acumulada de Pb na FV20 é bastante superior à obtida para a F20,  $241,46 \pm 19,23$  e  $314,38 \pm 24,83$  mg de Pb  $\text{kg}^{-1}$  MS, para 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb, respetivamente.

A acumulação de Pb é efetivamente superior na raiz da planta adulta, comparativamente à parte aérea. Na R20, a exposição a 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb resulta numa acumulação muito superior (em comparação com a planta jovem) de  $23448,8 \pm 2200,4$  e  $32129,4 \pm 3925,5$  mg de Pb  $\text{kg}^{-1}$  MS, respetivamente. A explicação para este aumento do teor de Pb nas raízes já foi referida no **Capítulo IV**.

Na **Figura 5.39** também se apresentam as percentagens de Pb acumulado em plantas adultas na parte aérea em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %). Estes resultados indicam que efetivamente existe muito pouca translocação de Pb para a parte aérea da planta adulta.

Em F20 não existem grandes variações nas percentagens acumuladas de Pb quando expostas a 125  $\mu\text{M}$  (1,2 %) ou 150  $\mu\text{M}$  (1,5 %), evidenciando que ao fim deste período de exposição existe uma quantidade muito baixa deste elemento que é translocada para a parte aérea. O efeito que se verifica na acumulação superior de chumbo nas folhas velhas também se reflete nas percentagens acumuladas de Pb. Na F20 os valores percentuais de translocação são inferiores aos presentes na FV20 (2,0 %).

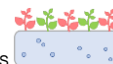
Na **Figura 5.40** apresentam-se as principais variações obtidas para cada elemento químico devido à presença de Pb em solução nutritiva, tanto para a folha como para a raiz da planta adulta. (os respetivos valores encontram-se na **Tabela B6**).



**Figura 5.40** – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F20, R20 e FV20 ao fim de 20 dias de exposição a 125 (a) e 150  $\mu$ M (b) de Pb.

A presença de Pb afeta negativamente tanto a acumulação da maior parte dos elementos químicos pela raiz como a sua translocação para a parte aérea. Existe uma maior (Ca) ou menor absorção do elemento químico pelas raízes (maior parte dos elementos químicos, à exceção do Mg) e (ii) a sua posterior translocação para a parte aérea. No caso do Mn e Cu não existem diferenças na absorção pela raiz, mas verifica-se uma diminuição do seu teor na parte aérea (F20, 125 e 150  $\mu$ M), o que significa que a absorção pela raiz não é afetada, mas a sua posterior translocação é.

A exposição a 125  $\mu$ M de Pb interfere na acumulação de Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na F20, de Na, Ca, Fe e Zn na R20 e de Na e K na FV20. A contaminação com 150  $\mu$ M de Pb é a que mais afeta o equilíbrio de nutrientes absorvidos. Há uma diminuição significativa na acumulação de



Na, K, Mn, Fe, Cu e Zn pela F20 e de Na, K, Ca, Fe e Zn na R20. Na FV20 são afetados os mesmos elementos que na R20, com exceção do Ca.

Para ambas as contaminações existe um estímulo na absorção de Ca, na F20, assim como uma diminuição do seu teor na raiz, evidenciando que o Ca absorvido é translocado para a parte superior da planta. Qiao et al. (2015) referiram que a exposição a 25  $\mu\text{M}$  de Pb levou a uma diminuição da acumulação de Na, Fe e Zn assim como um aumento na absorção de Ca.

A exposição ao Pb diminui a concentração de cátions divalentes como o Zn, Ca, Cu e Mn, provavelmente por terem semelhanças estruturais que originam competição pela entrada na planta. O Pb tem a particularidade de afetar a absorção de nutrientes, tal como referiram Kopittke et al. (2007a), num estudo em que a exposição a Pb (0-20  $\mu\text{M}$ ) levou a uma diminuição nos teores de Ca, Cu, Zn e Mn na parte aérea de *Chloris gayana* e *Brachiaria decumbens*, bem como uma diminuição na absorção de K apenas para a espécie *Chloris gayana*. Esta diminuição pode estar relacionada com o facto de o Pb afetar bastante a morfologia da raiz originando uma diminuição da absorção pela raiz, afeta a translocação dos elementos químicos das raízes até à parte aérea, provocando uma alteração na distribuição desses elementos pela planta.

A diminuição acentuada nos níveis de potássio e cálcio resulta em alterações na razão K/Ca e que pode ter um grande impacto no balanço hídrico, o que pode explicar teores de água baixos verificados, principalmente nas plantas contaminadas com a concentração superior de chumbo.

A limitação na absorção de Fe está associada ao aparecimento de cloroses e/ou degradação do sistema fotossintético, tal como observado visualmente nas plantas contaminadas com 150  $\mu\text{M}$  de Pb (**Figura 5.39**).

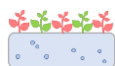
#### 5.4.3.2.3. Caracterização da resposta da planta adulta

Os resultados obtidos para as folhas novas, raiz e folhas velhas da planta adulta contaminada com Pb estão representados nas **Tabelas 5.19, 5.20 e 5.21**, respetivamente.

##### *Folha nova – 125 $\mu\text{M}$ Pb (planta adulta)*

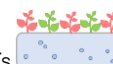
Na F20 contaminada com 125  $\mu\text{M}$  de Pb não se observaram diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas nem nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse.



**Tabela 5.17** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Pb.

		F20		
	Unidade	0 μM	125 μM Pb	150 μM Pb
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	μg g <sup>-1</sup>	468,5±35,7a*	494,7±68,0a	561,1±98,3a*
MDA	μM g <sup>-1</sup>	0,64±0,05a*	0,48±0,08ab	0,40±0,09b
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse				
clorofila a	μmol g <sup>-1</sup>	0,51±0,09ab	0,66±0,09a*	0,46±0,02b
clorofila b	μmol g <sup>-1</sup>	0,13±0,03ab	0,17±0,02a*	0,11±0,01b
clorofila total	μmol g <sup>-1</sup>	0,64±0,10ab	0,83±0,11a*	0,61±0,05b
antocianinas	μmol g <sup>-1</sup>	0,071±0,010a*	0,059±0,006ab	0,047±0,003b*
compostos fenólicos	mg g <sup>-1</sup>	0,25±0,04a	0,33±0,02a*	0,27±0,06a
PAL	U g <sup>-1</sup>	0,29±0,06a	0,34±0,09a	0,31±0,05a*
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	184,7±8,5a	298,8±48,4b*	228,8±37,2ab
% RSA	%	44,6±5,9a	66,0±12,9b*	63,8±1,1ab
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	174,7±6,5a*	187,5±29,0ab*	108,9±23,0b
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,21±0,04a*	0,32±0,03b*	0,30±0,03b*
POD	U g <sup>-1</sup>	0,485±0,018a*	0,229±0,004b*	0,319±0,048c
APX	U g <sup>-1</sup>	2,06±0,27a*	2,05±0,39a*	0,90±0,12b
GPX	U g <sup>-1</sup>	94,4±10,2a	91,8±8,1a	302,7±5,7b*
GR	U g <sup>-1</sup>	0,068±0,017a	0,093±0,014a	0,095±0,005a
Metabolitos antioxidantes				
ASA	μmol g <sup>-1</sup>	1,12±0,13a	2,93±0,45b*	0,96±0,06a*
DHA	μmol g <sup>-1</sup>	0,55±0,13a*	0,54±0,07a	1,19±0,16b
ASC	μmol g <sup>-1</sup>	1,67±0,30a	3,47±0,39b*	2,15±0,21a*
GSH	μmol g <sup>-1</sup>	0,6±0,1a	1,4±0,3b	0,9±0,1a
GSSG	μmol g <sup>-1</sup>	0,20±0,04a	0,23±0,18a	0,25±0,13a
TGSH	μmol g <sup>-1</sup>	0,80±0,04a*	1,63±0,27b	1,15±0,15a

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controlo.



**Tabela 5.18** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Pb.

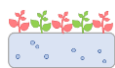
		R20		
	Unidade	0 µM	125 µM Pb	150 µM Pb
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	40,2±3,7a*	63,4±10,1b	67,6±13,4b
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,26±0,07a	0,43±0,05b*	0,27±0,02a
Defesa Antioxidante				
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	112,0±1,3a*	96,2±2,0b*	81,9±2,7c*
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,03±0,01a	0,07±0,01ab*	0,09±0,02b*
POD	U g <sup>-1</sup>	1,99±0,22a*	1,43±0,13b*	1,19±0,29b*
APX	U g <sup>-1</sup>	1,17±0,14a	1,03±0,07a	1,33±0,23a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,0217±0,0005a*	0,0320±0,0067a	n.d.
Metabolitos antioxidantes				
ASA	µmol g <sup>-1</sup>	0,82±0,05a	0,66±0,05b	0,70±0,08ab

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; n.d. significa não detetado; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controlo.

**Tabela 5.19** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na FV20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Pb.

		FV20		
	Unidade	0 μM	125 μM Pb	150 μM Pb
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	μg g <sup>-1</sup>	1290,2±45,7a	845,2±97,8b	746,5±155,9b
MDA	μM g <sup>-1</sup>	5,72±0,09a	5,98±0,06a	6,12±0,08a
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse compostos fenólicos				
	mg g <sup>-1</sup>	0,61±0,06a	1,04±0,09b	0,50±0,09a
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	420,0±14,8a	469,1±39,6a	414,5±70,9a
% RSA	%	82,5±5,9a	85,2±1,3a	85,1±0,8a
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,21±0,03a	0,10±0,03b	0,12±0,02b
POD	U g <sup>-1</sup>	0,45±0,16a	0,23±0,04ab	0,18±0,02b
APX	U g <sup>-1</sup>	1,24±0,38a	1,23±0,26a	0,56±0,08b
GR	U g <sup>-1</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
Metabolitos antioxidantes				
ASA	μmol g <sup>-1</sup>	3,04±0,25a	1,89±0,21b	1,91±0,34b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; n.d. significa não detetado; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controlo.



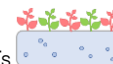
No entanto, existe um aumento significativo da atividade antioxidante total, indicando a existência de resposta ao stresse induzido pela presença de Pb. Há um aumento significativo da atividade da CAT e dos metabolitos antioxidantes não-enzimáticos, ASA e GSH. Estes mecanismos de resposta, provavelmente, são responsáveis pela degradação e/ou eliminação do  $H_2O_2$ , daí a não existência de danos oxidativos. A presença de Pb origina uma diminuição na atividade da POD e não se verificam diferenças significativas nos restantes mecanismos enzimáticos, evidenciando que estas enzimas não estão envolvidas na remoção do peróxido de hidrogénio e que a diminuição na atividade enzimática está relacionada com o efeito inibitório do Pb no próprio sistema enzimático.

Isto indica que a CAT é a única enzima responsável por manter o equilíbrio redox durante stresse oxidativo. Islam et al. (2007) também observaram que a exposição a Pb provocou um aumento significativo nos teores de CAT, ASA e GSH. Gupta et al. (2009) detetaram um aumento no teor de ASA em milho exposto a 100-200  $\mu M$  de Pb ao fim de 1, 4 e 7 dias de tratamento.

A relação entre os níveis de GSH e a presença de Pb, e a capacidade antioxidante deste metabolito em remover o excesso de ROS também foi verificada por outros autores (Gupta et al., 2010; Liu et al., 2009b; Mishra et al., 2006; Piechalak et al., 2002; Verbruggen et al., 2009). Kumar et al. (2012a) referiram, num estudo realizado em folhas de *Talinum triangulare* (250, 500, 750, 1000, 1250  $\mu M$  Pb; 1, 3, 5, 7 dias), um aumento significativo na razão GSH/GSSG em função do aumento da concentração de Pb presente em solução nutritiva. Os autores referem que os níveis de GSH poderão ser importantes na manutenção de um sistema antioxidante eficaz que permite à planta sobreviver apesar da acumulação de quantidades tóxicas de Pb. Maldonado-Magaña et al. (2011) observaram que concentrações abaixo de 2413  $\mu M$  de Pb não tiveram efeito significativo na peroxidação lipídica e levaram ao aumento dos teores de GSH, sugerindo que a capacidade da planta em resistir ao stresse induzido pelo Pb está relacionada com o metabolismo da glutathione, tal como se verifica no presente estudo para as folhas novas das plantas de alface contaminadas com 125  $\mu M$ .

#### *Folha nova – 150 $\mu M$ Pb (planta adulta)*

Na F20 contaminada com 150  $\mu M$  também não se observam diferenças significativas nos teores de  $H_2O_2$  e o teor de MDA diminui significativamente, sugerindo que existe a ativação de enzimas ou metabolitos antioxidantes que atuam neste substrato e que influenciam o teor de  $H_2O_2$  nas células.

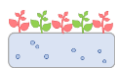


Ao contrário do que seria de esperar, uma vez que se trata de uma concentração elevada de Pb, não se observam diferenças na atividade antioxidante total, apesar de haver um ligeiro aumento, embora não significativo. Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse verifica-se uma diminuição nos teores de antocianinas. Kumar et al. (2012a) referiram que a atividade da PAL é inibida na presença de metais pesados, tendo como consequência a inibição da síntese de antocianinas. No entanto, parece ser possível que 500 e 750  $\mu\text{M}$  de Pb estimulem a atividade de PAL, resultando num aumento da produção de antocianinas que sequestram os iões metálicos nos vacúolos. A exposição a concentrações mais elevadas de Pb (1000 e 1250  $\mu\text{M}$ ) já demonstraram ser tóxicas para as células da planta e originaram a inibição da atividade da PAL e a diminuição da biossíntese de antocianinas. No presente estudo, provavelmente, é o que se verifica nas folhas novas das plantas de alface expostas a 150  $\mu\text{M}$  de Pb sendo esta concentração de Pb tóxica e levando à diminuição da produção de antocianinas.

Na atividade das enzimas antioxidantes, existe uma diminuição significativa da SOD, POD e APX, e um aumento significativo na atividade da CAT e GPX. Esta diminuição na atividade da SOD indica que provavelmente existe um *oxidative burst* com a rápida conversão do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  que conduziu a uma rápida acumulação desta espécie, mas que rapidamente foi removido pela atividade da CAT e GPX. Esta inativação da atividade da SOD, POD e APX, possivelmente, ocorre devido aos níveis elevados de Pb presentes no meio e, por isso, não estão envolvidas nos mecanismos de defesa face a este metal tóxico.

A CAT é ativa no controlo dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido em condições de stresse (Mittler, 2002). A elevada atividade enzimática da GPX comparativamente à CAT, sugere que a GPX poderá ser uma melhor resposta intrínseca face aos danos oxidativos induzidos por esta concentração de Pb durante o tempo de exposição escolhido. Outros autores também observaram um aumento na atividade da CAT devido à exposição a Pb (Piotrowska et al., 2009; Reddy et al., 2005; Zhang et al., 2007).

Um aumento significativo na atividade da GPX indica que esta enzima apresenta um papel fundamental. Esta enzima compete com a CAT pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e daí não existem teores significativos de peróxido uma vez que esta enzima está ativa na sua remoção. É a maior fonte de proteção contra níveis baixos de stresse oxidativo, o que faz sentido pelos resultados obtidos para a atividade antioxidante total, parâmetros de indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas, e de avaliação da intensidade do stresse. A GPX também pode atuar na remoção dos produtos resultantes da peroxidação dos lípidos, decompondo os hidroperóxidos em água (ou álcool), e esta pode ser uma explicação para a diminuição



significativa nos teores de MDA. Singh et al. (2010) referiram que a GPX apresentou uma elevada afinidade para o  $H_2O_2$ , comparativamente à CAT, em plantas de *Najas indica* expostas a 1-100  $\mu M$  de Pb.

Não se observam diferenças significativas na GR, apesar de existir um ligeiro aumento da sua atividade que pode estar relacionada com a atividade da GPX. A atividade da GR permite obter GSH que é utilizada como substrato da GPX para degradação de  $H_2O_2$ . No entanto, também não se verificaram diferenças significativas nos teores dos metabolitos antioxidantes, ASA e GSH.

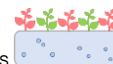
#### *Folha velha – 125 e 150 $\mu M$ Pb (planta adulta)*

Na FV20, nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas não existem diferenças significativas, o que também está concordante com o não aparecimento de sintomas visíveis de toxicidade na parte aérea. Também não se observam diferenças significativas na atividade antioxidante total para ambas as concentrações de Pb testadas. Não se verifica nenhum mecanismo enzimático e não-enzimático ativo na remoção do peróxido das células. Este facto sugere que a capacidade das plantas em aumentar a proteção antioxidante para combater o efeito negativo devido à presença de Pb parece ser limitada e que a exposição a elevadas concentrações de Pb resulta numa diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (CAT, POD, APX), assim como na não deteção de resultados concretos (SOD, GR), e que provavelmente outros mecanismos estão ativos no controlo dos níveis de peróxido de hidrogénio nas células.

#### *Raiz – 125 e 150 $\mu M$ Pb (planta adulta)*

Na R20 exposta a 125  $\mu M$  de Pb existe um aumento dos níveis de  $H_2O_2$  e MDA, sugerindo a existência de danos oxidativos e a ocorrência de stresse oxidativo. Kaur et al. (2013) também observaram uma indução da peroxidação lipídica e de  $H_2O_2$  em raízes de trigo. Isto está de acordo com os resultados obtidos por outros autores que referem um aumento nos teores de MDA e  $H_2O_2$  em raízes de alho (Liu et al., 2009a), ervilha (Małecká et al., 2009), milho (Gupta et al., 2009) e brássicas (Singh et al., 2011).

No entanto, não se verificam diferenças significativas na atividade enzimáticas da CAT, APX e GR, sugerindo que estas enzimas não estão ativas na remoção de ROS. A atividade da SOD e POD diminuem de forma significativa, sugerindo uma inativação da sua atividade. Também se observa uma diminuição significativa no teor de ASA. Estes resultados



evidenciam que não existe uma resposta eficiente na raiz para combater o excesso de peróxido no meio o que resulta em danos oxidativos.

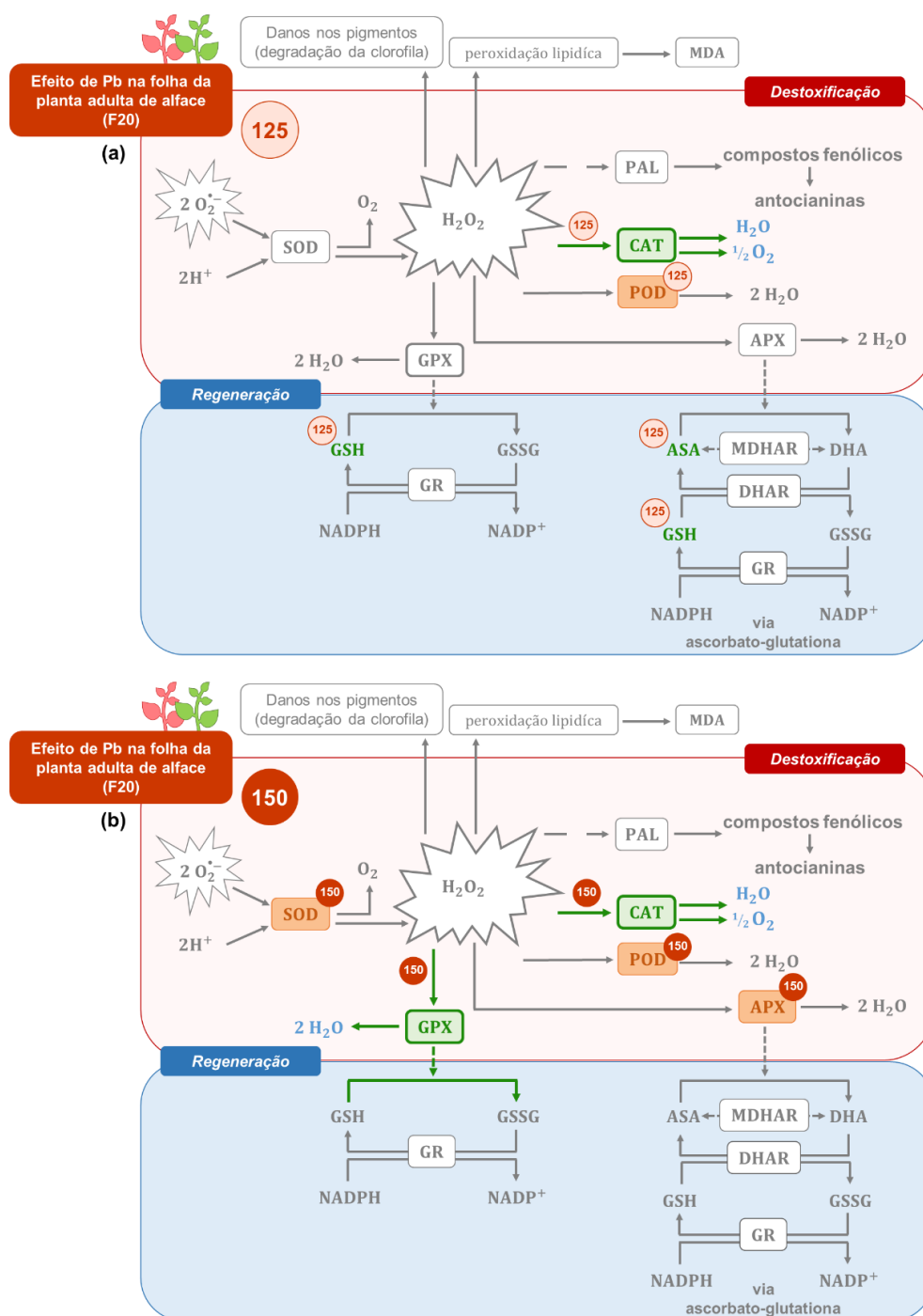
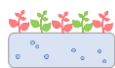
Na R20 contaminada com 150  $\mu\text{M}$  de Pb verifica-se um aumento do teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mas não existem diferenças significativas nos níveis de MDA o que sugere a existência de mecanismos eficientes de resposta que evitam a ocorrência de danos oxidativos. Os resultados obtidos para as enzimas antioxidantes comprovam isso sugerindo que a CAT é a única enzima crucial na remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  na raiz. Isto está de acordo com a atividade da CAT estar associada à remoção de níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em excesso sendo isso potenciado pela elevada acumulação de Pb neste órgão (**Figura 5.39**). Kaur et al. (2013) referiram que a atividade da CAT também aumentou de forma significativa na ordem dos 11-70 %, comparativamente ao controlo, em resposta a 50-500  $\mu\text{M}$  de Pb em raízes de trigo. Huang et al. (2012) também observaram um aumento na atividade da CAT, em raízes de *Sedum alfredii* expostas a 200  $\mu\text{M}$  de Pb.

Os resultados indicam que a atividade da SOD e POD diminui e que não se observam diferenças na atividade da APX e GR, indicando que não estão envolvidas nos mecanismos de defesa face a estas condições de ensaio. Também não se observam diferenças significativas nos teores de ASA.

#### **5.4.3.2.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta adulta face à toxicidade induzida por Pb**

Na **Figura 5.41** encontra-se representado o esquema metabólico que permite fazer a avaliação da resposta antioxidante da planta adulta face à toxicidade induzida por Pb em folhas.

Em F20, a resposta da planta contaminada com uma concentração mais baixa de chumbo baseia-se na ativação de mecanismos enzimáticos como a CAT, aliado aos mecanismos antioxidantes não-enzimáticos, como o ASA e GSH. Ambos são cruciais por manter os níveis de peróxido baixos nas células e evitar a formação de danos oxidativos. A exposição a uma concentração mais elevada de chumbo ativa apenas mecanismos enzimáticos, como a CAT e GPX, que são eficientes em neutralizar os teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  formados.



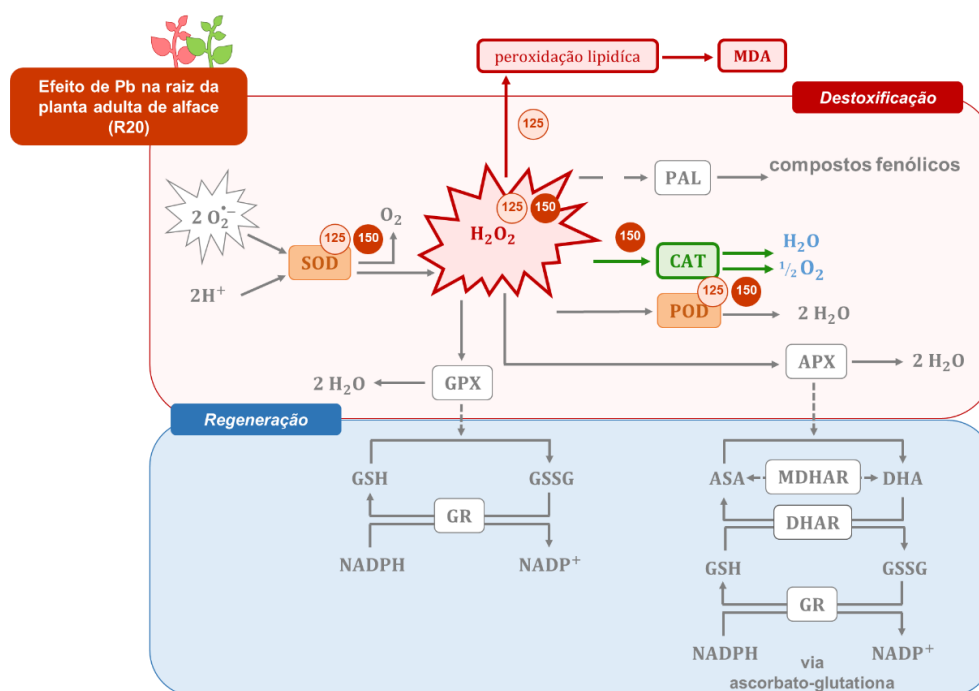
**Figura 5.41** – Representação esquemática da resposta antioxidante em F20 de alface M4E contaminada com Pb. Nos esquemas estão representadas as vias ou compostos que são ativos para 125 (a) e 150 µM (b) de Pb (indicado na figura como 125 e 150).

A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais. A laranja estão representados os mecanismos enzimáticos que diminuem na defesa.





A avaliação da resposta antioxidante da planta adulta face à toxicidade induzida por Pb encontra-se esquematizada na **Figura 5.42** para a raiz.

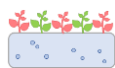


**Figura 5.42** – Representação esquemática da resposta antioxidante em R20 de alface M4E contaminada com 125 e 150  $\mu M$  Pb (indicado na figura como 125 e 150).

A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais. A laranja estão representados os mecanismos enzimáticos que diminuem na defesa.

O Pb acumula-se em grande quantidade e, preferencialmente, na raiz das plantas de alface. Este é o órgão mais afetado e onde a única resposta da planta é a ativação da CAT (no caso das plantas contaminadas com 150  $\mu M$ ). Na concentração mais baixa em teste, a planta não consegue ter uma resposta eficiente face ao stresse, ocorrendo danos oxidativos nas células. Neste caso, a planta parece não ter uma resposta suficiente para combater o stresse induzido por este elemento.

A presença de Pb tem a particularidade de inativar algumas das enzimas que são cruciais na resposta da planta, tanto na raiz como na parte aérea. Este comportamento evidencia a toxicidade deste elemento e mostra uma incapacidade da planta em ativar os mecanismos de respostas que, normalmente, constituem mecanismos de defesa antioxidantes em situações de toxicidade com outros contaminantes. Contudo, no caso da parte aérea o mecanismo de resposta da planta que é ativado evita que ocorram danos oxidativos, para ambas as concentrações. Porém, na raiz provavelmente por ser o órgão com maior concentração de Pb



presente, a exposição a 125  $\mu\text{M}$  resulta numa produção acentuada de peróxido de hidrogénio e não existem mecanismos ativos na sua remoção, havendo danos oxidativos, sendo isso também comprovado pelos sintomas visíveis de toxicidade observados neste órgão. Uma concentração superior de Pb já ativa um aumento na atividade enzimática da CAT, que apesar dos níveis elevados de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , parece controlar a ocorrência de danos oxidativos.

#### *Conclusões intercalares*

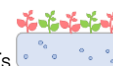
Na planta jovem não se observam sintomas visíveis de toxicidade e também não existe uma diminuição significativa na biomassa da parte aérea, havendo até um estímulo da biomassa da raiz com o aumento da concentração de chumbo presente em solução nutritiva.

Na planta adulta, com a exposição a 125  $\mu\text{M}$  não se observam sintomas visíveis de toxicidade na parte aérea, enquanto que uma exposição a uma concentração superior origina uma diminuição no tamanho da planta e o aparecimento de ligeiras cloroses. Para ambas as concentrações, a raiz é o órgão mais afetado, apresentando um crescimento atrofiado, amarelecimento gradual e a presença de pontos negros nas extremidades. Relativamente à massa fresca da parte aérea e raiz existe um estímulo no crescimento nas plantas expostas a 125  $\mu\text{M}$ . A contaminação com 150  $\mu\text{M}$  provoca uma diminuição significativa na biomassa de ambos os órgãos da planta.

A presença de Pb interfere com a absorção de água, sendo esse efeito evidente na planta adulta exposta a 150  $\mu\text{M}$  onde ocorre uma acentuada diminuição da biomassa da raiz, o que tem efeito direto numa diminuição da absorção de água e nutrientes e no seu consequente transporte para a parte aérea da planta.

O chumbo também influencia a absorção de todos os elementos químicos em estudo que são essenciais ao desenvolvimento da planta e, na maior parte dos casos, sempre no sentido de uma diminuição. Esta diminuição pode estar relacionada com o facto de o chumbo afetar bastante a morfologia da raiz que origina uma diminuição na absorção destes elementos por competição com o Pb, afetando também a translocação destes elementos para a parte aérea.

A planta adulta acumula quantidades superiores de Pb comparativamente à planta jovem. Contudo, em ambos os estados de desenvolvimento, a acumulação de chumbo ocorre de forma preferencial na raiz, sendo esta acumulação superior quanto maior a concentração de chumbo presente em solução nutritiva. O chumbo é o elemento que se acumula em maior quantidade nas raízes das plantas de alface, jovens e adultas, comparativamente aos



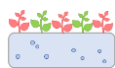
restantes EPTs em estudo (Cd, Cr, Ni, Zn). Isto está concordante com o facto de o Pb ser muito pouco translocado para a parte aérea e daí os níveis baixos acumulados de Pb em folhas dada as elevadas concentrações aplicadas em solução nutritiva.

Apesar disso, a concentração de Pb nas folhas de alface excede o limite máximo permitido pela legislação em vigor para hortícolas de folha, 0,30 mg de Pb kg<sup>-1</sup> MF (Commission Regulation (EU) 1005/2015). Na planta jovem, as folhas acumulam 2,28±0,17 mg de Pb kg<sup>-1</sup> MF (125 µM) e 8,10±1,08 mg de Pb kg<sup>-1</sup> MF (150 µM). Ao fim de 20 dias de exposição as folhas acumulam 5,46±0,30 mg de Pb kg<sup>-1</sup> MF (125 µM) e 16,11±2,34 mg de Pb kg<sup>-1</sup> MF (150 µM), tendo em atenção os teores de água nas folhas de alface.

Na planta jovem, a presença de Pb induz uma resposta eficiente em folhas uma vez que não se observa o aumento dos níveis de peróxido de hidrogénio nem ocorrem danos oxidativos. A exposição a 125 µM ativa mecanismos antioxidantes enzimáticos (POD) e o metabolismo da glutathione (GSH) parece ser eficaz nesta resposta. Na presença de uma concentração superior, a destoxificação é realizada através de mecanismos enzimáticos (CAT) e por outros mecanismos do metabolismo secundário (PAL, síntese de antocianinas), que são responsáveis por manter baixos os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por este motivo, também não se observam sintomas visíveis de toxicidade.

Na planta adulta, em folhas continua a existir este controlo dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a não existência de peroxidação lipídica, apesar das elevadas concentrações de chumbo presentes em solução nutritiva. No caso da exposição a uma concentração menor de chumbo há a resposta concertada entre mecanismos enzimáticos (CAT) e não-enzimáticos (ASA, GSH), enquanto com uma concentração superior de chumbo no meio existe apenas o aumento da atividade enzimática da CAT e GPX, que são cruciais por manter baixos os níveis de stresse. Nas folhas velhas os resultados obtidos sugerem que a capacidade das plantas em aumentar a proteção antioxidante para combater o efeito negativo devido à presença de Pb parece ser limitada e que, provavelmente, outros mecanismos (que não foram determinados no presente estudo) estão ativos no controlo dos níveis de peróxido de hidrogénio nas células.

Na raiz, parte do chumbo acumulado deve, possivelmente, ficar retido nas paredes celulares e/ou ligado a quelatos, sendo posteriormente armazenado em vacúolos. Na planta jovem, existe um controlo dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que resulta no não aparecimento de danos oxidativos, assim como, de sintomas visíveis de toxicidade neste órgão. Os mecanismos de resposta responsáveis por este controlo são, maioritariamente, enzimáticos para 125 µM (CAT, POD) e 150 µM (CAT).



No entanto, na raiz da planta adulta, os sintomas visíveis de toxicidade observados e os valores excessivamente elevados acumulados indicam que o excesso de Pb presente poderá não estar a ser neutralizado neste órgão. A capacidade de resposta da planta parece ser limitada. A presença de Pb tem a particularidade de inativar algumas das enzimas que são cruciais na resposta da planta. Este comportamento evidencia a toxicidade deste elemento e mostra uma incapacidade da planta em ativar os mecanismos de respostas que, normalmente, constituem mecanismos de defesa antioxidantes em situações de toxicidade com outros EPTs. Isto ocorre em particular no caso das plantas contaminadas com 125  $\mu\text{M}$ , em que não ocorre uma resposta suficiente para combater o stresse oxidativo provocado pela presença de Pb, e daí o aparecimento de danos oxidativos. Nas plantas expostas a 150  $\mu\text{M}$ , a CAT parece ser efetiva no controlo do aparecimento de danos oxidativos, apesar do aumento dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Para ambos os estados de desenvolvimento é importante referir que a presença de diferentes concentrações de chumbo permite ativar diferentes mecanismos de resposta, sendo esta capacidade de resposta mais eficiente em folhas. A raiz é o órgão mais afetado pela presença deste elemento.

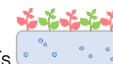
#### 5.4.4. Níquel

##### 5.4.4.1. Planta jovem

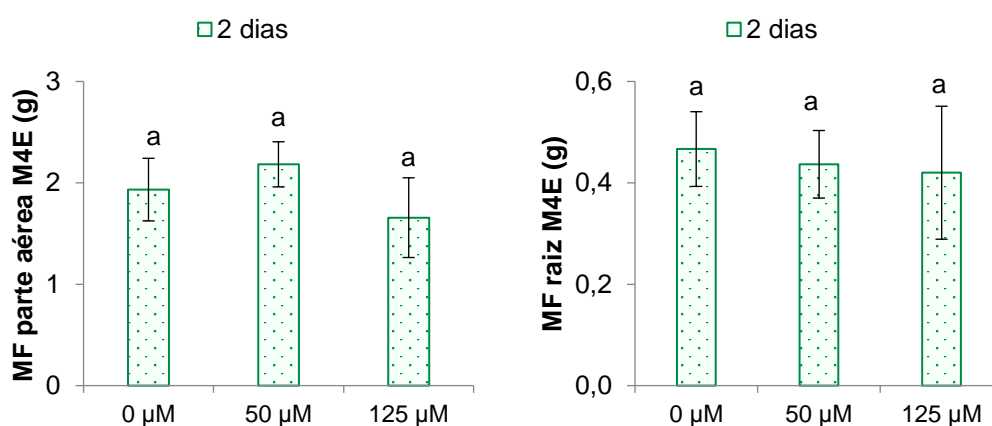
##### 5.4.4.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Ni

O registo fotográfico registado das plantas jovens, ao fim de 2 dias de contaminação com Ni, para as diferentes modalidades (controlo, 50 e 125  $\mu\text{M}$ ) encontra-se apresentado na **Figura 5.43**. Na **Figura 5.44** encontram-se os resultados obtidos para a massa fresca, da parte aérea e da raiz, da planta jovem.

Não se observam sintomas visíveis de toxicidade, na parte aérea e na raiz, das plantas jovens contaminadas com Ni, indicando que este nível de contaminação (50, 125  $\mu\text{M}$ ) durante este período de tempo (2 dias de contaminação) não permite que se observem visualmente efeitos tóxicos nas plantas jovens de alface.



**Figura 5.43** – Registo fotográfico da planta adulta de alface M4E ao 2º dia de exposição com Ni.

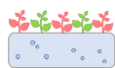


**Figura 5.44** – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas jovens de alface M4E ao fim de 2 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50 e 125 µM de Ni.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controlo ( $n=3$ ).

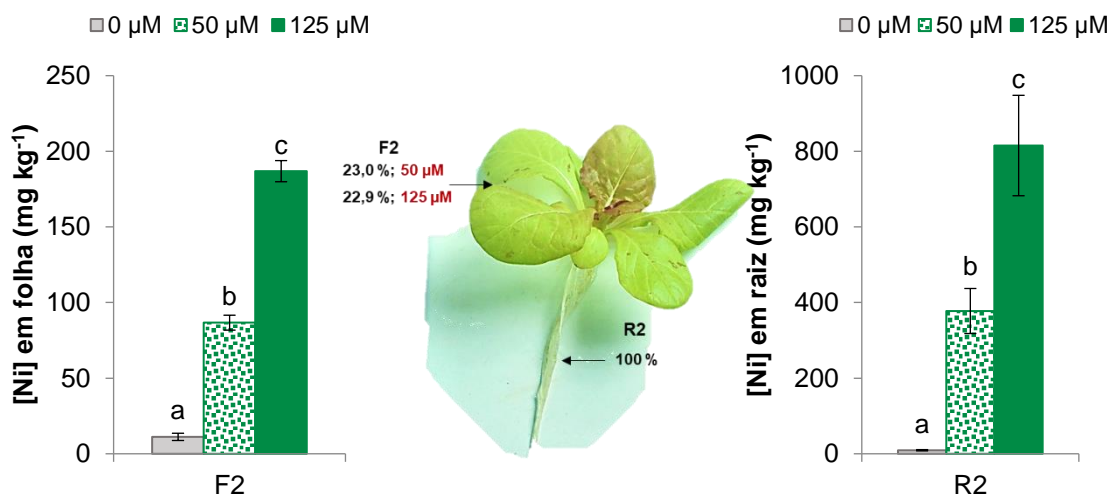
O crescimento da planta aparentemente também não é afetado, uma vez que não se observam de diferenças significativas na massa fresca, da parte aérea e da raiz, de plantas contaminadas com níquel em relação às plantas controlo.

No presente trabalho calcularam-se os valores médios das percentagens de humidade para a biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controlo, considerando-se a exposição ao fim de 2 dias com 50 e 125 µM de Ni. Verifica-se que existe uma ligeira diminuição nos teores de água das plantas controlo (parte aérea: 90,6 %; raiz: 89,1 %) em relação às plantas contaminadas com 50 µM (parte aérea: 84,8 %; raiz: 83,4 %) e 125 µM (parte aérea: 84,9 %; raiz: 83,4 %), nestas condições de ensaio. A presença de concentrações excessivas de Ni, aparentemente, interfere ligeiramente com a absorção de água pela planta.



#### 5.4.4.1.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos

Na **Figura 5.45** apresentam-se os resultados obtidos para a acumulação de Ni na folha e na raiz da planta jovem.



**Figura 5.45** – Concentração de Ni em folha e raiz de plantas jovens de M4E ao fim de 2 dias de exposição a 50 e 125 µM de Ni.

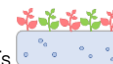
As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ). Os valores indicados correspondem às percentagens de Ni nas folhas em relação à quantidade na raiz (considerada como 100 %).

Quanto maior a quantidade de Ni aplicada no meio, maior a quantidade deste elemento acumulada pela planta de alface jovem nos seus órgãos.

A F2 acumula  $86,70 \pm 4,93$  e  $186,85 \pm 7,00$  mg kg<sup>-1</sup> MS, quando exposta a 50 e 125 µM de Ni, respetivamente. A quantidade deste elemento acumulada na planta jovem é bastante superior às obtidas para o Cd, o Cr e o Pb, muito provavelmente porque o Ni é considerado um elemento essencial para a planta havendo menos restrição na sua entrada.

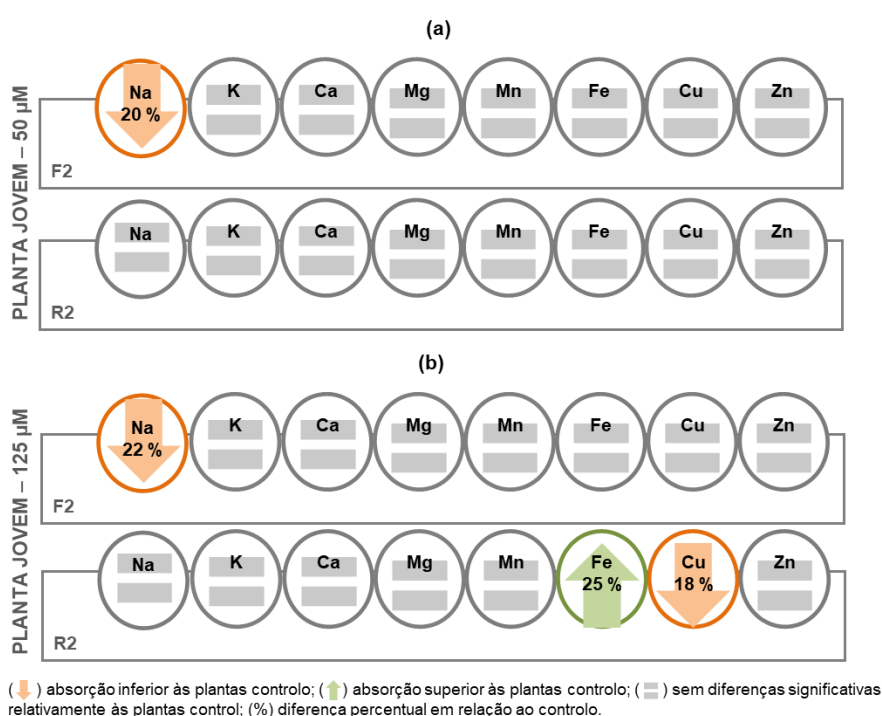
Na R2, a exposição a 50 e 125 µM de Ni resulta numa acumulação superior de  $377,57 \pm 59,53$  e  $815,20 \pm 132,82$  mg de Ni kg<sup>-1</sup> MS, respetivamente. Este comportamento de acumulação superior na raiz também foi observado e descrito no **Capítulo IV**.

Na **Figura 5.45** também estão representadas as percentagens de Ni acumuladas na parte aérea em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas jovens contaminadas com 50 e 125 µM de Ni.



A exposição a 50  $\mu\text{M}$  resulta numa translocação de 23,0 % e a contaminação com 150  $\mu\text{M}$  em 22,9 %, o que demonstra que uma quantidade razoável de Ni absorvida é translocada para a parte aérea da planta. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para os teores de Ni acumulados na parte aérea e raiz, evidenciando que, efetivamente, parte do níquel é translocado para a parte aérea, sendo bastante móvel na planta.

Na **Figura 5.46** apresentam-se as principais tendências observadas na variação dos teores dos elementos químicos devido à presença de Ni em solução nutritiva, para a folha e raiz da planta jovem (os respetivos valores encontram-se na **Tabela B7**).



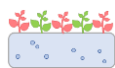
**Figura 5.46** – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F2 e R2 ao fim de 2 dias de exposição a 50 (a) e 125  $\mu\text{M}$  (b) de Ni.

Na planta jovem, a presença de Ni aparentemente tem pouco efeito na absorção dos restantes elementos químicos porque, provavelmente, se trata de um elemento essencial para a planta.

A única diferença que se observa com a exposição a 50 e 125  $\mu\text{M}$  de Ni, em F2, é uma diminuição significativa na absorção de Na.

Na R2, apenas a exposição a 125  $\mu\text{M}$  de Ni provoca um decréscimo significativo no teor de Cu e um aumento da concentração de Fe. Isto ocorre porque o Ni apresenta propriedades





químicas semelhantes e, por isso, compete com este elemento na absorção, acumulação e utilização pela planta podendo aumentar, diminuir ou não alterar os seus teores.

#### 5.4.4.1.3. Caracterização da resposta da planta jovem

Na **Tabela 5.20** estão os resultados obtidos para os parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Ni.

##### *Folha nova – 50 µM Ni (planta jovem)*

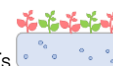
Na F2 exposta a 50 µM de Ni não se observam diferenças significativas nos teores de MDA, havendo, no entanto, um aumento significativo no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mas que não é suficiente para que ocorram danos o que indica uma possível resposta eficiente da planta jovem face ao stresse induzido por este tratamento com níquel.

A atividade antioxidante total aumenta significativamente, podendo indicar que o sistema antioxidante da planta está ativo. Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse observa-se um aumento significativo na atividade da PAL, teor de polifenóis totais e na concentração de antocianinas. Isto evidencia que este nível de stresse ativa reações do metabolismo secundário, nomeadamente a produção de compostos fenólicos e de antocianinas que atuam como antioxidantes.

Não se observam diferenças significativas nas atividades de enzimas antioxidantes nem dos metabolitos antioxidantes não-enzimáticos, ASA e GSH. Estes resultados demonstram que existe uma menor resposta por parte destes mecanismos ao stresse oxidativo induzido por este tratamento.

##### *Folha nova – 125 µM Ni (planta jovem)*

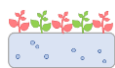
Na F2 exposta a 125 µM de Ni não se observam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas o que evidencia um menor grau de stresse oxidativo presente nas plantas sujeitas a este tratamento ou que a planta apresenta uma resposta eficiente face ao stresse induzido por esta concentração superior de níquel.



**Tabela 5.20** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Ni.

	Unidade	F2		
		0 µM	50 µM Ni	125 µM Ni
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	125,6±8,7a	218,2±46,1b	146,1±37,3a
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,22±0,02a	0,27±0,02a	0,20±0,05a
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse				
clorofila a	µmol g <sup>-1</sup>	0,36±0,03a	0,41±0,04a	0,36±0,07a
clorofila b	µmol g <sup>-1</sup>	0,096±0,008a	0,106±0,001a	0,088±0,017a
clorofila total	µmol g <sup>-1</sup>	0,460±0,039a	0,535±0,004a	0,426±0,084a
antocianinas	µmol g <sup>-1</sup>	0,04±0,01a	0,06±0,002b	0,06±0,01b
compostos fenólicos	mg g <sup>-1</sup>	0,14±0,08a	0,34±0,04b	0,20±0,06ab
PAL	U g <sup>-1</sup>	0,20±0,03a	0,27±0,04b	0,18±0,02a
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	133,0±12,1a	288,0±57,0b	187,6±17,0a
% RSA	%	30,0±5,2a	57,4±2,2b	42,2±9,9a
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	124,3±15,6a	110,4±19,8a	109,9±12,3a
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,068±0,002ab	0,126±0,035a	0,064±0,020b
POD	U g <sup>-1</sup>	0,15±0,01a	0,17±0,04a	0,16±0,01a
APX	U g <sup>-1</sup>	1,63±0,26a	1,05±0,08b	0,93±0,13b
GPX	U g <sup>-1</sup>	82,31±4,90a	78,41±5,58a	80,82±1,97a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,093±0,022a	0,072±0,004a	0,116±0,022a
Metabolitos antioxidantes				
ASA	µmol g <sup>-1</sup>	0,95±0,09a	0,92±0,07a	1,12±0,22a
DHA	µmol g <sup>-1</sup>	0,27±0,02a	0,83±0,14b	0,28±0,02a
ASC	µmol g <sup>-1</sup>	1,22±0,07a	1,75±0,20b	1,40±0,15ab
GSH	µmol g <sup>-1</sup>	0,7±0,2a	0,8±0,2ab	1,1±0,1b
GSSG	µmol g <sup>-1</sup>	0,21±0,04a	0,14±0,02b	0,18±0,04ab
TGSH	µmol g <sup>-1</sup>	0,91±0,04a	0,94±0,19a	1,28±0,63b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controlo.



Não se observam diferenças significativas na atividade antioxidante total, havendo apenas um ligeiro aumento relativamente às plantas controlo. Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse apenas se verifica um aumento significativo na concentração de antocianinas, comparativamente às plantas controlo. Este aumento da produção de antocianinas pode indicar um possível papel destes compostos na regulação dos níveis de ROS nas células.

Não se observam diferenças significativas nos mecanismos enzimáticos, existindo até a diminuição na atividade da APX (também ocorre o mesmo comportamento com a exposição a 50  $\mu\text{M}$ ), provavelmente, porque a exposição a estas concentrações de níquel resulta nesta inibição. No entanto, existe a ativação de mecanismos antioxidantes não-enzimáticos, nomeadamente, um aumento significativo do teor de GSH. Este metabolito atua de forma isolada como composto de defesa antioxidante na remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e, por isso, o seu nível presente nas células não ser significativo.

Na **Tabela 5.21** estão os resultados obtidos para os parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Ni.

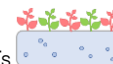
**Tabela 5.21** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Ni.

		R2		
	Unidade	0 μM	50 μM Ni	125 μM Ni
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	μg g <sup>-1</sup>	55,0±4,0a	93,0±8,0b	82,8±9,7b
MDA	μM g <sup>-1</sup>	0,267±0,049a	0,210±0,002a	0,199±0,039a
Defesa Antioxidante				
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	133,1±6,7a	111,5±11,7a	112,5±8,6a
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,029±0,010a	0,034±0,004a	0,035±0,008a
POD	U g <sup>-1</sup>	3,78±0,15a	3,65±0,22a	3,48±0,31a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,079±0,003a	0,067±0,010a	0,031±0,006b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controlo.

#### *Raiz – 50 e 125 $\mu\text{M}$ Ni (planta jovem)*

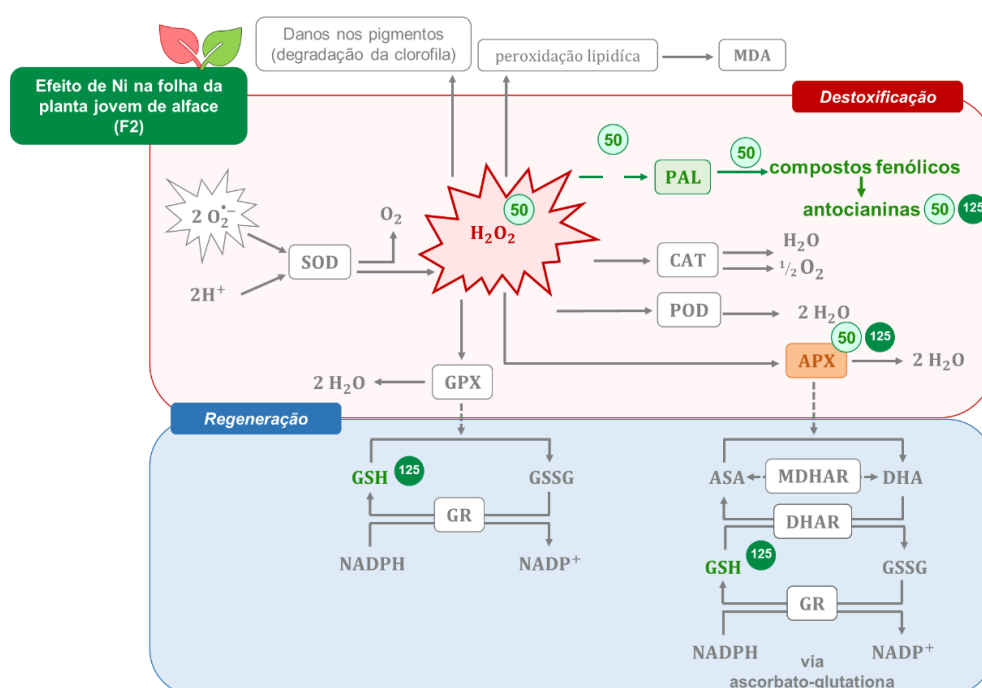
Na R2 exposta a 50 e 125  $\mu\text{M}$  de Ni apenas se observa um aumento do teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o que pode evidenciar a presença de stresse oxidativo na raiz. No entanto, não se verificam danos oxidativos nas células, uma vez que não se observam diferenças significativas nos teores de



MDA. As enzimas antioxidantes parecem não estar ativas na remoção do excesso de peróxido, podendo estar ativos outros tipos de mecanismos que não foram determinados no presente estudo e que evitam a peroxidação dos lípidos.

#### 5.4.4.1.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta jovem face à toxicidade induzida por Ni

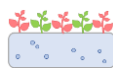
O esquema metabólico exemplificativo da resposta da planta jovem face à presença de Ni é apenas apresentado para a folha na **Figura 5.47**.



**Figura 5.47** – Representação esquemática da resposta antioxidante em F2 de alfafa M4E contaminada com 50 e 125  $\mu M$  Ni (indicado na figura como 50 e 125).

A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais. A laranja estão representados os mecanismos enzimáticos que diminuem na defesa.

Em folhas, a presença de Ni induz um aumento na atividade da PAL e a síntese de compostos fenólicos e de antocianinas, que são fundamentais na eliminação das ROS em excesso. Os mecanismos que garantem uma resposta eficaz das plantas parecem ser essencialmente não-enzimáticos, assegurados pela GSH que aparenta ser um metabolito antioxidante fundamental na resposta da planta face a estas condições de stresse.

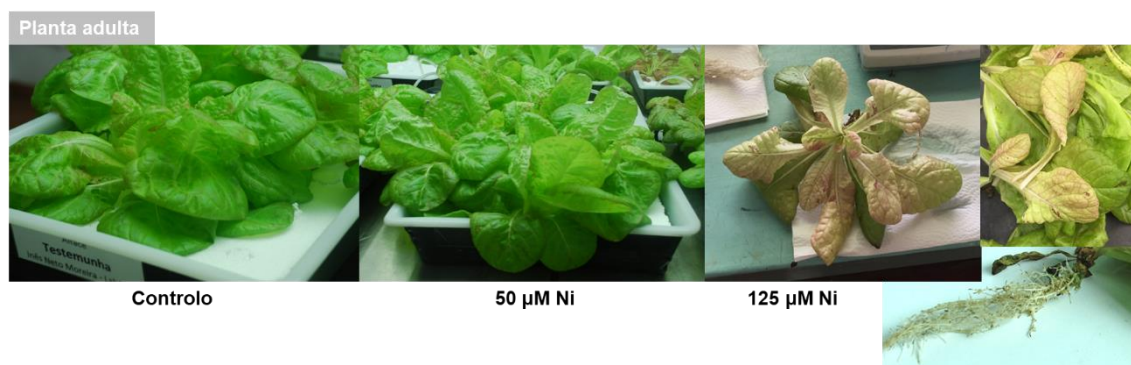


Na raiz não se observa uma resposta da planta e, deste modo, não é possível desenhar um esquema representativo. Os resultados obtidos indicam que se observa um aumento do teor de peróxido de hidrogénio o que evidencia a presença de stresse oxidativo neste órgão, não estando ativos os mecanismos determinados no presente estudo, podendo estar a atuar outros tipos de mecanismos de defesa.

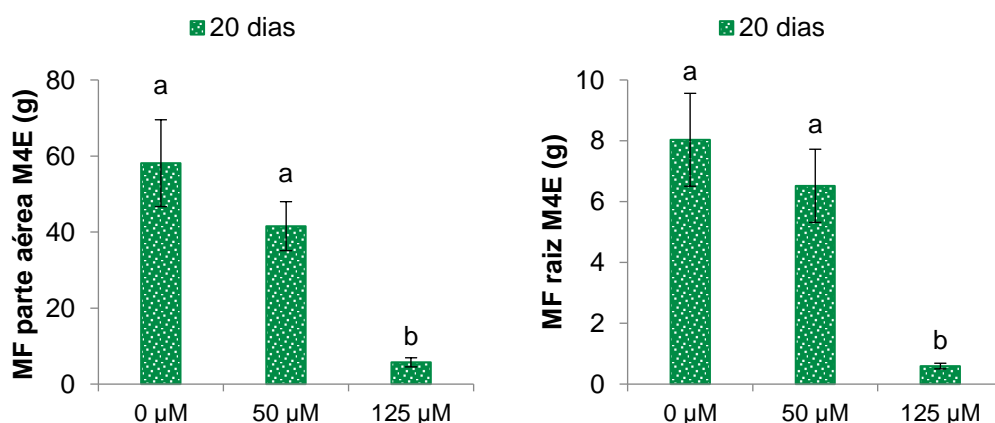
#### 5.4.4.2. Planta adulta

##### 5.4.4.2.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Ni

O registo fotográfico das plantas adultas ao fim de 20 dias de contaminação com Ni (controlo, 50 e 125  $\mu\text{M}$ ) estão apresentadas na **Figura 5.48**. Na **Figura 5.49** encontram-se os resultados obtidos para a massa fresca, da parte aérea e da raiz, da planta adulta.

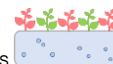


**Figura 5.48** – Registo fotográfico da planta adulta de alface M4E ao 20º dia de exposição com Ni.



**Figura 5.49** – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas adultas de alface M4E ao fim de 20 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50 e 125  $\mu\text{M}$  de Ni.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controlo ( $n=3$ ).



Visualmente não se observam sintomas visíveis de toxicidade nas plantas contaminadas com 50  $\mu\text{M}$  de Ni, comparativamente às plantas controle. No entanto, com a exposição a 125  $\mu\text{M}$  é notória a diminuição do tamanho da parte aérea e da raiz. Nas folhas observa-se o aparecimento de cloroses intensas e uma coloração rosada nas folhas mais novas. A raiz apresenta necroses nas extremidades e uma coloração amarelada. Estes sintomas visíveis também já foram descritos no **Capítulo IV** com maior detalhe.

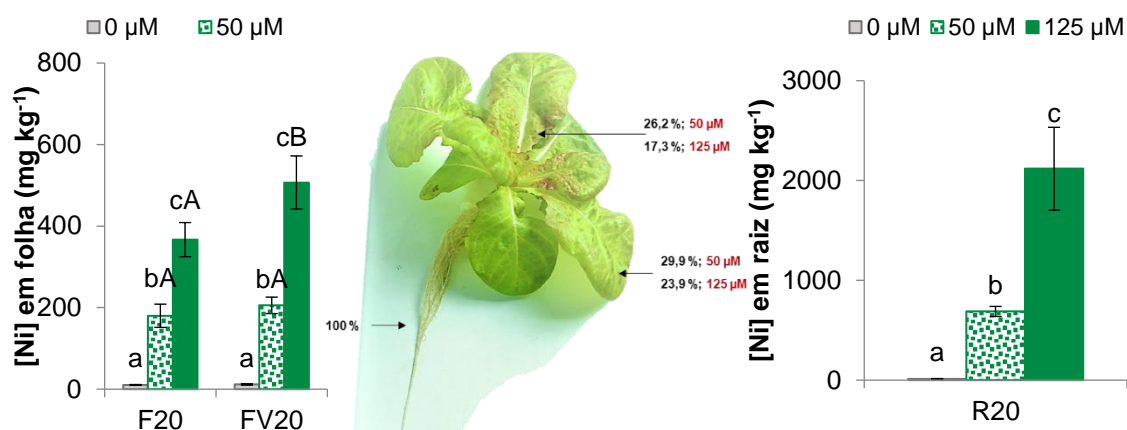
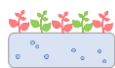
Neste tempo de exposição, o crescimento da planta é afetado, comparativamente às plantas controle. Na planta adulta, existe uma tendência para ocorrer uma diminuição do crescimento da planta, sendo essa diminuição bastante significativa para a massa fresca da parte aérea e da raiz das plantas contaminadas com 125  $\mu\text{M}$  de Ni. Esta diminuição na biomassa em plantas expostas a Ni também foi observada por outros autores em trigo (Gajewska e Skłodowska, 2007). A não existência de diferenças na biomassa das plantas contaminadas com 50  $\mu\text{M}$  de Ni e controle, está de acordo com não observação de sintomas tóxicos.

Através da observação dos gráficos é possível verificar que tanto a parte aérea como a raiz são bastante afetadas em termos de biomassa para a contaminação mais elevada estudada. Se se calcular os valores relativos à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controle, é possível verificar que caso da contaminação com 50  $\mu\text{M}$  existe uma diminuição de 28,5 % na parte aérea, e de 18,8 % na raiz. Com a exposição a 15  $\mu\text{M}$ , já se verifica uma diminuição superior, havendo uma diminuição de 90,2 % e de 92,6 %, para a parte aérea e raiz, respetivamente.

No presente trabalho calculou-se os valores médios das percentagens de humidade para a biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controle, considerando-se a exposição ao fim de 20 dias com 50 e 125  $\mu\text{M}$  de Ni. Verifica-se que existe uma ligeira diminuição no teor de água das plantas controle (parte aérea: 96,0 %; raiz: 96,1 %) em relação às plantas contaminadas com 50  $\mu\text{M}$  (parte aérea: 93,4 %; raiz: 89,6 %) e 125  $\mu\text{M}$  (parte aérea: 80,8 %; raiz: 76,4 %). A diminuição do tamanho da planta verificada pode estar relacionada com a alteração do balanço hídrico, pois o Ni pode levar a absorção deficiente de água (**Capítulo IV**).

#### 5.4.4.2.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos

Na **Figura 5.50** apresentam-se os resultados obtidos para a acumulação de Ni na folha e raiz da planta adulta.



**Figura 5.50** – Concentração de Ni em folhas e raiz de plantas adultas de M4E ao fim de 20 dias de exposição a 50 e 125  $\mu M$  de Ni.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ). As letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre F20 e FV20. Os valores indicados correspondem às percentagens de Ni nas folhas em relação à quantidade na raiz (considerada como 100 %).

A acumulação de Ni nas diferentes partes da planta é proporcional à quantidade de Ni aplicada em solução nutritiva

A F20 acumula  $180,07 \pm 28,53$  e  $366,80 \pm 41,93$  mg de Ni  $kg^{-1}$  MS, quando exposta a 50 e 125  $\mu M$  de Ni, respetivamente. Na FV20, a quantidade acumulada é ligeiramente superior à obtida para a F20,  $205,72 \pm 20,20$  e  $506,92 \pm 65,10$  mg de Ni  $kg^{-1}$  MS, para 50 e 125  $\mu M$  de Ni, respetivamente.

Na R20, a exposição a 50 e 125  $\mu M$  de Ni resulta numa acumulação de  $688,50 \pm 50,47$  e  $2119,00 \pm 414,53$  mg de Ni  $kg^{-1}$  MS, respetivamente. Na planta adulta também se verifica uma concentração de Ni na raiz superior à obtida nas folhas, sendo essa acumulação superior na raiz exposta a 125  $\mu M$  de Ni. Estes teores elevados de níquel presentes na raiz ocorrem porque a restrição à sua entrada não é tão acentuada, tal como referido no **Capítulo IV**. Para além disso, também existe uma concentração elevada de níquel na parte aérea, tanto na folha nova como na folha velha (superiores aos obtidos para Cd, Cr ou Pb), evidenciando que a planta tolera elevadas quantidades de Ni nos seus tecidos.

A existência de efeitos visíveis de toxicidade na parte aérea e na raiz, tal como se observa na **Figura 5.48**, está relacionada com este nível superior de acumulação de Ni presente na planta adulta exposta a 125  $\mu M$ .



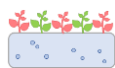


Na **Figura 5.50** também se apresentam as percentagens de Ni acumulado na parte aérea de plantas adultas, relativamente à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %). Os resultados obtidos para a F20 exposta a 50  $\mu\text{M}$  (26,2 %) e 125  $\mu\text{M}$  (17,3 %), e na FV20 contaminada com 50  $\mu\text{M}$  (29,9 %) e 125  $\mu\text{M}$  (23,9 %), indicam que parte do Ni é efetivamente translocado para a parte aérea das plantas (tal como descrito no **Capítulo IV**). Estes resultados evidenciam que o níquel é um elemento bastante móvel na planta, quando comparado com o Cr ou Pb. A translocação deste elemento mantém-se semelhante num meio pouco ou muito contaminado, no caso das folhas velhas. Nas folhas novas já existe uma ligeira diminuição neste valor percentual para o nível de contaminação maior de níquel.

Na planta adulta, na **Figura 5.51** observam-se as alterações nos teores dos elementos químicos devido à presença de Ni, em solução nutritiva, tanto para as folhas como para a raiz (os respetivos valores encontram-se na **Tabela B8**).



**Figura 5.51** – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F20, R20 e FV20 ao fim de 20 dias de exposição a 50 (a) e 125  $\mu\text{M}$  (b) de Ni.



A exposição a 50  $\mu\text{M}$  de Ni resulta num estímulo à absorção de Ca, Mn, Fe e Zn na F20. Na R20 apenas existe uma diminuição significativa no teor de Na. Na FV20 diminui significativamente a concentração de Fe e Cu e aumenta o teor de Zn.

Na F20, a exposição a uma concentração superior de Ni (125  $\mu\text{M}$ ) desencadeia uma diminuição nos teores de Mn, Fe e Cu, havendo apenas um aumento significativo na concentração de Ca. Na FV20 não se observam diferenças significativas para nenhum elemento químico, o que poderá indicar uma resposta da planta em remover o excesso de Ni presente. Na R20 há um aumento nos teores de Na e Zn.

O níquel provoca uma maior (Na,Zn) ou menor (Fe, Cu, Na) absorção de elementos químicos pelas raízes e afeta negativamente a posterior translocação para a parte aérea de Mn, Fe, Cu e promove um aumento dos níveis de Ca em folhas novas. Uma das explicações para estes resultados é que o Ni apresenta propriedades químicas semelhantes com o Ca, Mn, Fe, Cu e Zn (Chen et al., 2009; DalCorso et al., 2014). Por este motivo, compete com estes elementos na absorção, acumulação e utilização pela planta. Khan e Khan (2010) referiram que o excesso de Ni compete com vários cátions, em particular, com o Fe, impedindo que este seja absorvido pela planta, o que resulta em deficiências neste nutriente, substituições na molécula de clorofila e o aparecimento de cloroses, tal como verificado nas plantas de alface do presente estudo (**Figura 5.48**).

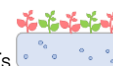
#### 5.4.4.2.3. Caracterização da resposta da planta adulta

Os resultados obtidos para a F20, R20 e FV20 da planta adulta exposta durante 20 dias com Ni encontram-se apresentados nas **Tabelas 5.22, 5.23 e 5.24**, respetivamente.

##### *Folha nova – 50 e 125 $\mu\text{M}$ Ni (planta adulta)*

Apesar de o Ni não conseguir originar diretamente ROS, na F20 exposta a 50 e 125  $\mu\text{M}$  de Ni observa-se um aumento crescente e significativo dos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com o aumento da concentração de Ni, o que pode indicar uma forma indireta de indução do aumento de ROS.

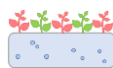
De facto, estes resultados indicam a existência de stresse oxidativo e, consequentemente, no aparecimento de danos oxidativos nas células uma vez que os teores de MDA também apresentam a mesma tendência verificada para o  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Tabela 5.22** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Ni.

	Unidade	F20		
		0 µM	50 µM Ni	125 µM Ni
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	172,8±57,4a	304,1±41,4b	653,7±22,0c*
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,20±0,05a	0,31±0,03b	0,59±0,02c*
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse				
clorofila a	µmol g <sup>-1</sup>	0,52±0,03a*	0,48±0,10a	0,49±0,05a*
clorofila b	µmol g <sup>-1</sup>	0,15±0,01a*	0,12±0,03a	0,12±0,01a*
clorofila total	µmol g <sup>-1</sup>	0,67±0,03a*	0,57±0,14a	0,61±0,06a*
antocianinas	µmol g <sup>-1</sup>	0,04±0,01a	0,08±0,02b	0,08±0,01b
compostos fenólicos	mg g <sup>-1</sup>	0,34±0,08ab*	0,37±0,07a	0,18±0,04b
PAL	U g <sup>-1</sup>	0,20±0,01a	0,28±0,01b	0,27±0,01b*
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	91,8±19,8a	227,5±47,2b	154,8±20,7ab
% RSA	%	25,5±3,5a	47,7±5,0b	36,6±6,6a
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	97,5±7,9a	108,5±6,4a	108,9±4,6a
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,10±0,01a*	0,19±0,01b*	0,06±0,02c
POD	U g <sup>-1</sup>	0,25±0,02a*	0,26±0,03a*	0,40±0,10b*
APX	U g <sup>-1</sup>	1,23±0,03a*	1,34±0,27a	1,56±0,33a*
GPX	U g <sup>-1</sup>	75,8±3,1a	65,3±0,7a*	62,9±10,3a*
GR	U g <sup>-1</sup>	0,09±0,02ab	0,14±0,01a*	0,09±0,03b
Metabolitos antioxidantes				
ASA	µmol g <sup>-1</sup>	0,75±0,06a*	1,28±0,09b*	1,16±0,09b
DHA	µmol g <sup>-1</sup>	0,47±0,02a*	1,02±0,10b	0,90±0,03b*
ASC	µmol g <sup>-1</sup>	1,22±0,10a*	2,30±0,10b*	2,06±0,13b*
GSH	µmol g <sup>-1</sup>	1,0±0,1a	3,6±0,4b*	3,2±0,7b*
GSSG	µmol g <sup>-1</sup>	0,44±0,08a*	0,20±0,03b*	0,31±0,07b*
TGSH	µmol g <sup>-1</sup>	1,44±0,1a*	3,80±0,5b*	3,51±0,6b*

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controlo.

**Tabela 5.23** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Ni.

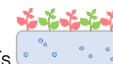
	Unidade	R20		
		0 µM	50 µM Ni	125 µM Ni
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	28,5±2,4a*	33,3±1,2a*	105,6±10,8b
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,11±0,02a*	0,12±0,01a*	0,20±0,03b
Defesa Antioxidante				
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	84,3±7,2a*	74,4±12,3a*	100,4±17,9a
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,004±0,001a*	0,008±0,005a*	0,046±0,008b
POD	U g <sup>-1</sup>	0,82±0,11a*	2,37±0,02b*	2,95±0,14c
APX	U g <sup>-1</sup>	0,89±0,03a	0,72±0,02a	2,10±0,15b
GR	U g <sup>-1</sup>	0,0521±0,0002a*	0,0430±0,0057ab*	0,0337±0,0070b
Metabolitos antioxidantes				
ASA	µmol g <sup>-1</sup>	0,21±0,04a	0,18±0,04a	0,51±0,03b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.

**Tabela 5.24** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na FV20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Ni.

	Unidade	FV20		
		0 µM	50 µM Ni	125 µM Ni
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	329,2±98,4a	421,3±86,6a	642,7±67,3b
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,37±0,02a	0,57±0,09a	1,2±0,28b
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse				
compostos fenólicos	mg g <sup>-1</sup>	0,16±0,03a	0,40±0,09b	0,39±0,03b
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	73,1±28,1a	331,0±32,5b	346,3±44,3b
% RSA	%	22,7±5,0a	68,1±10,4b	54,8±2,8b
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	140,3±10,5a	169,1±20,9ab	192,2±27,0b
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,020±0,001a	0,086±0,007b	0,027±0,019a
POD	U g <sup>-1</sup>	0,11±0,01a	0,16±0,01b	0,16±0,03b
APX	U g <sup>-1</sup>	0,85±0,15a	1,08±0,30a	0,72±0,09a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,056±0,009a	0,021±0,004b	0,086±0,019c
Metabolitos antioxidantes				
ASA	µmol g <sup>-1</sup>	1,12±0,07a	1,66±0,10b	1,68±0,10b

O símbolo  $\pm$  representa o desvio padrão; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.



Estes resultados estão de acordo com outros autores que também observaram um aumento significativo nos teores de ROS e na peroxidação lipídica como resultado da presença de Ni (Boominathan e Doran, 2002; Gajewska et al., 2012; Gajewska e Sklodowska, 2005; Gajewska et al., 2006; Maheshwari e Dubey, 2009; Rao e Sresty, 2000; Yusuf et al., 2012). Kumar et al. (2012b) referiram que o tratamento com 200 e 400  $\mu\text{M}$ , ao fim de 12 dias, resultou num aumento do teor de peróxido de hidrogénio, tanto em raízes como em folhas de plantas de cevada.

*Folha nova – 50  $\mu\text{M}$  Ni (planta adulta)*

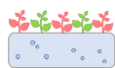
Na F20 exposta a 50  $\mu\text{M}$  de Ni há um aumento significativo na atividade antioxidante total, comparativamente às plantas controlo, indicando a possível existência de ativação de mecanismos efetivos de resposta. Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse apenas se observa um aumento na atividade da PAL, que resulta na produção significativa de antocianinas, evidenciando que estes pigmentos atuam como importantes compostos antioxidantes na defesa da planta. No entanto, o aumento significativo destes pigmentos não foi observado visualmente (**Figura 5.48**).

Há a ativação da CAT que atua na remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em excesso, não havendo diferenças significativas em mais nenhuma atividade enzimática, o que torna esta enzima fundamental no combate ao stresse oxidativo induzido por 50  $\mu\text{M}$  de Ni. Para além disso, o ASA e a GSH estão ativos como metabolitos antioxidantes na defesa da planta. Outros autores referiram que a GSH (Fabiano et al., 2015; Freeman et al., 2004) e o ASA (Maheshwari e Dubey, 2009) são cruciais na destoxificação de Ni. Porém, estes mecanismos não-enzimáticos e enzimáticos descritos não são suficientes para evitar a presença de danos oxidativos nas células.

*Folha nova – 125  $\mu\text{M}$  Ni (planta adulta)*

Não se observam diferenças significativas na atividade antioxidante total, apesar de haver um ligeiro aumento comparativamente ao controlo, podendo evidenciar uma tendência para que exista uma resposta da planta face ao stresse induzido pelo Ni.

Na F20 contaminada com 125  $\mu\text{M}$  de Ni também se observa, nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, um aumento significativo na atividade da PAL e na concentração de antocianinas, o que se verifica visualmente (**Figura 5.48**). Apesar de se verificar o aparecimento de cloroses, não se observam diferenças significativas nos teores de clorofilas (a, b e total) comparativamente às plantas controlo.



A presença de concentrações elevadas de Ni leva à diminuição significativa da atividade da CAT. Esta diminuição na atividade da CAT também foi observada por outros autores (Gajewska et al., 2006; Maleva et al., 2009; Pandey e Sharma, 2002; Rao e Sresty, 2000; Soares et al., 2016).

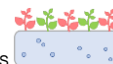
Existe uma resposta antioxidante enzimática por parte da POD que é ativa na conversão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água. O aumento significativo da atividade enzimática da POD, comparativamente às outras enzimas, sugere que a POD poderá ser uma melhor resposta intrínseca face aos danos oxidativos induzidos por estas condições de stresse. É importante referir que esta enzima nos dá uma menor informação em relação aos mecanismos de tolerância face ao stresse oxidativo, devido à sua localização celular diversa e porque atua em diversos substratos para além do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Estes resultados estão concordantes com a diminuição do teor de compostos fenólicos que são o substrato desta enzima e devem estar a ser consumidos a uma taxa elevada. Isto está de acordo com o observado por Gajewska e Skłodowska (2007) em que verificaram uma inibição significativa na atividade da CAT em 16 % e 20 %, para o 3º e 6º dia de exposição com 100 µM de Ni, respetivamente. A única enzima que mostrou aumento de atividade foi a POD, havendo um aumento de 447 % e 458 %, comparativamente ao controlo, para os mesmos períodos e contaminação. Os autores referiram que a função da POD em situações de stresse, para além de atuar no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é uma enzima que participa na biossíntese de lenhina e, consequentemente na diminuição da plasticidade das paredes celulares, pelo que um aumento na sua atividade, poderá estar associado a uma diminuição no crescimento das folhas.

Relativamente aos metabolitos antioxidantes não-enzimáticos observa-se um aumento do teor de ASA e de GSH. Este comportamento evidencia uma forte tendência de atuação destes metabolitos como importantes antioxidantes na defesa da planta. No entanto, nem um aumento significativo da atividade da PAL e antocianinas, nem a presença de mecanismos enzimáticos (POD) e não-enzimáticos (ASA, GSH) parecem ser eficientes no controlo dos níveis de peróxido de hidrogénio nem em evitar o aparecimento de danos oxidativos nas células.

#### *Folha velha – 50 e 125 µM Ni (planta adulta)*

Na FV20 exposta a 50 µM de Ni não se observam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas. No entanto, a atividade antioxidante total aumenta significativamente por comparação com as plantas controlo. Existe um aumento



significativo nas atividades da CAT e POD, estando estas enzimas ativas na conversão do  $H_2O_2$  em água. Os níveis baixos de  $H_2O_2$  presentes resultam da existência desta resposta enzimática eficiente. Observa-se também um aumento da produção de compostos fenólicos, que são o substrato desta enzima. Para além disso, há um aumento significativo no teor de ASA que também é crucial como composto antioxidante não-enzimático.

Na FV20 exposta a 125  $\mu M$  de Ni já se verifica um aumento muito significativo dos teores de  $H_2O_2$ , que resultam em danos oxidativos comprovados através do aumento dos níveis de MDA. Este  $H_2O_2$  em excesso desencadeia uma resposta enzimática na planta, levando ao aumento significativo da atividade da SOD, POD e GR. A SOD é a primeira via de defesa dos mecanismos enzimáticos, indicando que o radical  $O_2^{\bullet-}$  está a ser convertido em  $H_2O_2$  e, este é, seguidamente, removido pela POD. O facto da atividade da POD aumentar, pode estar relacionado com o aumento dos níveis de polifenóis totais, uma vez que são substrato desta enzima, estando continuamente a ser produzidos. A atividade da GR aumenta significativamente, logo esta enzima poderá estar ativa na produção de GSH, tal como ocorre na F20. Existem também um aumento significativo no teor de ASA que também é crucial como composto antioxidante. Este aumento na atividade da GR provavelmente também é responsável pelo teor de ASA elevado, aumentando a tolerância ao stresse.

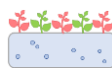
#### *Raiz – 50 e 125 $\mu M$ Ni (planta adulta)*

Na R20 exposta a 50  $\mu M$  de Ni não se observam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas. A única enzima antioxidante que apresenta um aumento significativo é a POD, podendo ser a responsável pela remoção dos níveis de  $H_2O_2$  nas células e pela não existência de danos oxidativos. Também não se observaram diferenças significativas no teor de ASA, evidenciando que este metabolito antioxidante não-enzimático não tem um papel fundamental para estas condições de ensaio.

Na R20 exposta a 125  $\mu M$  de Ni já existe um aumento significativo nos teores de  $H_2O_2$  que resultam em danos oxidativos através do aumento dos níveis de MDA. Este comportamento também foi observado por outros autores em raízes de *Zea mays* (Baccouch et al., 2001) *Triticum durum* (Hao et al., 2006) e de *Alyssum bertolonii* e *Nicotiana tabacum* (Boominathan e Doran, 2002).

Nas condições experimentais deste trabalho verifica-se que as enzimas CAT, POD e APX estão ativas na remoção destes níveis em excesso de peróxido. Estas concentrações excessivas de níquel resultam numa inibição da atividade da GR. Tal como outros EPTs, o Ni



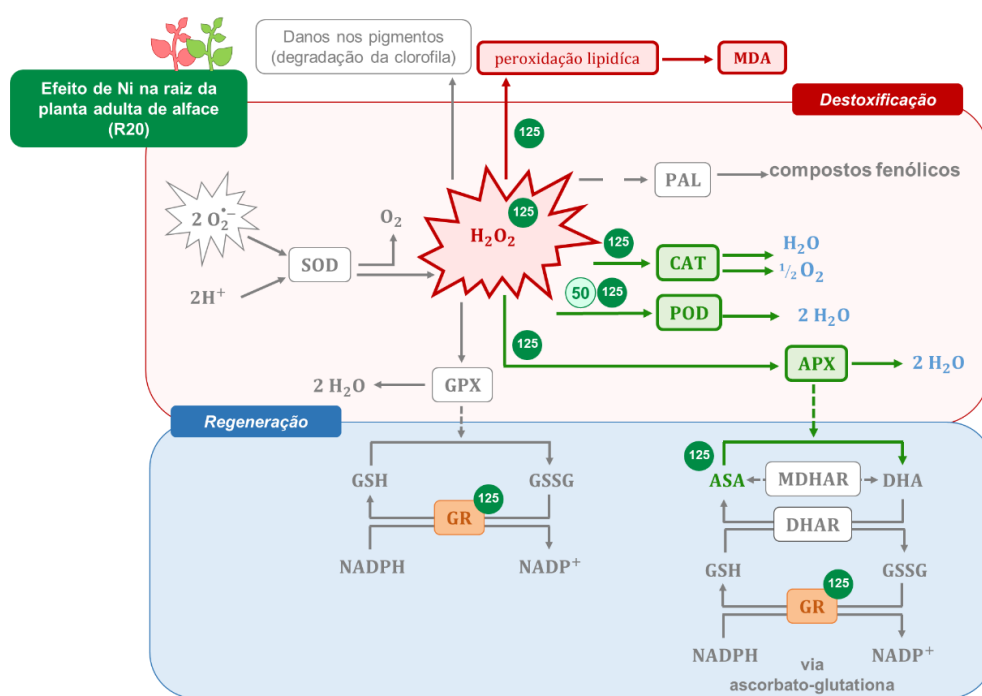


afeta vários processos fisiológicos, incluindo a atividade enzimática. Esta influência pode ser resultante de um efeito direto, por interação do Ni com os grupos -SH das proteínas, alterando a sua conformação e assim, causando a sua inativação (Muhammad e Muhammad, 2012).

Por outro lado, o teor de ASA aumenta significativamente o que se mostra coerente com o aumento da atividade da APX verificado. Na R20 exposta à concentração mais elevada de Ni, aparentemente, existe um maior número de enzimas em atividade para remover o excesso de  $H_2O_2$  presente e evitar a ocorrência de mais danos oxidativos.

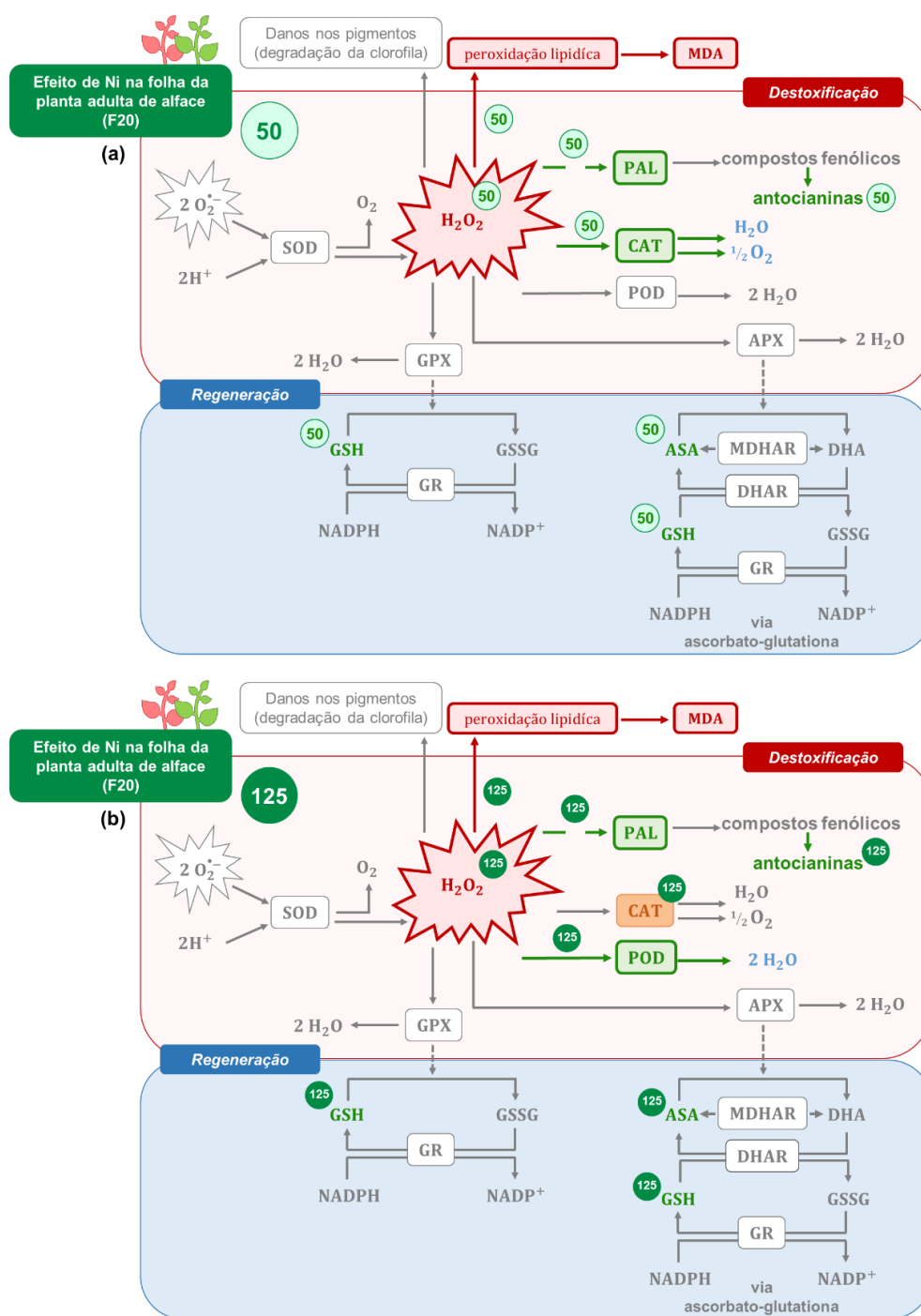
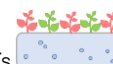
#### 5.4.4.2.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta adulta face à toxicidade induzida por Ni

Na planta adulta, a avaliação da resposta antioxidante de plantas expostas a Cr está representada para a raiz (**Figura 5.52**) e folha (**Figura 5.53**).



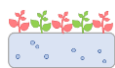
**Figura 5.52** – Representação esquemática da resposta antioxidante em R20 de alface M4E contaminada com 50 e 125  $\mu M$  Ni (indicado na figura como 50 e 125).

A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais. A laranja estão representados os mecanismos enzimáticos que diminuem na defesa.



**Figura 5.53** - Representação esquemática da resposta antioxidante em F20 de alface M4E contaminada com Ni. Nos esquemas estão representadas as vias ou compostos que são ativos para 50 (a) e 125 µM (b) de Ni (indicado na figura como 50 e 125).

A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais. A laranja estão representados os mecanismos enzimáticos que diminuem na defesa.



Em F20, a presença de Ni desencadeia uma resposta da planta que se baseia na ativação de reações do metabolismo secundário, como o aumento da atividade da PAL e, por consequência, na síntese de antocianinas. Há também a ativação de mecanismos enzimáticos (CAT, 50  $\mu$ M; POD, 125  $\mu$ M) e não-enzimáticos, como a produção de ASA e GSH (50 e 125  $\mu$ M). No entanto, esta resposta da planta não são suficientemente eficientes para evitar o aparecimento de danos oxidativos.

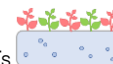
Na R20, para a concentração mais elevada de níquel estudada, observa-se uma resposta da planta com a ativação de enzimas antioxidantes (CAT, POD, APX) e síntese de metabolitos antioxidantes não-enzimáticos (ASA), mas que também não é eficiente no controlo dos níveis elevados de peróxido de hidrogénio nem de MDA presentes. Nas plantas contaminadas com 50  $\mu$ M, a POD é a única enzima responsável pela remoção dos níveis de  $H_2O_2$  nas células e que parece efetiva no controlo dos níveis desta ROS e pela não existência de danos oxidativos na raiz.

### *Conclusões intercalares*

Na planta jovem não se observam sintomas visíveis de toxicidade na parte aérea e na raiz das plantas de alface contaminadas com 50 e 125  $\mu$ M. Também não se verificam diferenças significativas na massa fresca da parte aérea e da raiz nestas plantas jovens sujeitas a 2 dias de contaminação.

Na planta adulta, a exposição a 50  $\mu$ M também não desencadeia o aparecimento de sintomas visíveis de toxicidade, ao contrário do que acontece com a contaminação com 125  $\mu$ M. Com este nível de contaminação mais elevado existe uma diminuição do tamanho da planta, o aparecimento de cloroses e uma coloração avermelhada nas folhas novas. A raiz apresenta um amarelecimento gradual e necroses nas extremidades. A massa fresca das plantas contaminadas com 50  $\mu$ M apresenta uma tendência para diminuir, sendo essa diminuição significativa para a parte aérea e raiz das plantas contaminadas com 125  $\mu$ M. Os valores percentuais obtidos na diminuição da biomassa refletem que esse nível de redução é idêntico para ambos os órgãos da planta.

O Ni interfere ligeiramente com a absorção de água pela planta, originando deficiências que se traduzem numa diminuição do tamanho da planta. Na planta jovem, o níquel interfere pouco com a absorção e acumulação pela planta de elementos químicos ( $\downarrow$ Na, Cu;  $\uparrow$ Fe). Na planta adulta, observam-se mais diferenças nos teores de elementos químicos ( $\downarrow$ Fe, Zn, Mn, Fe, Cu;



↑Na, Zn, Ca), comparativamente à planta jovem, tendo um efeito indireto na inibição/estimulação da absorção e transporte de nutrientes para a parte aérea da planta.

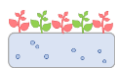
A planta adulta acumula quantidades superiores de Ni, por comparação com a planta jovem, tanto na parte aérea como na raiz. No entanto, as plantas jovens de alface acumulam uma grande quantidade de níquel nas folhas, nesta fase inicial de desenvolvimento (superior a Cd, Cr, Pb), assim como na planta adulta. Em ambos os estados de desenvolvimento, a acumulação preferencial de níquel ocorre na raiz porque é o órgão que está em contacto direto com o elemento e existe pouca restrição à sua entrada. Os valores percentuais de translocação refletem que o Ni é um elemento bastante móvel na planta, havendo translocação deste elemento para a parte aérea das plantas de alface.

Em relação ao Ni dado que não existe legislação em vigor para o limite máximo permitido em hortícolas de folha, são apenas interpretados os teores obtidos comparativamente com os valores normais de Ni presentes em plantas, nomeadamente, níveis inferiores a 1,0 mg de Ni kg<sup>-1</sup> MS segundo Nagajyoti et al. (2010) e entre 1-10 mg de Ni kg<sup>-1</sup> MS segundo Varennes (2003). Ao fim de 2 dias de exposição a concentração de Ni em folhas é de 86,70±4,93 mg de Ni kg<sup>-1</sup> MS (50 µM) e 186,85±7,00 mg de Ni kg<sup>-1</sup> MS (125 µM). Na planta adulta, esta acumulação é maior, 180,07±28,53 mg de Ni kg<sup>-1</sup> MS (50 µM) e 366,80±41,93 mg de Ni kg<sup>-1</sup> MS (125 µM). Todos os valores obtidos em folhas estão claramente acima dos valores normais apresentados.

Na planta jovem, em folhas, o nível de stresse desencadeado por estas concentrações de níquel ativa determinados mecanismos que conseguem, aparentemente, controlar os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma a evitar a presença de danos oxidativos. Na exposição a 50 µM a resposta da planta foca-se no aumento da atividade enzimática da PAL e síntese de compostos fenólicos e antocianinas, enquanto uma exposição a um nível de concentração superior (125 µM) tem como resposta, um aumento da síntese de antocianinas e na produção de GSH que neutraliza o possível efeito adverso induzido pela presença de Ni.

Na raiz da planta jovem apesar dos elevados níveis de peróxido de hidrogénio existentes, não se observa peroxidação lipídica, indicando que outros mecanismos de defesa estão a atuar e que não foram determinados no presente trabalho. Isto pode revelar que parte do Ni acumulado preferencialmente na raiz, poderá ficar retido nas raízes na forma de quelatos ou estar ligado às paredes celulares, sendo posteriormente armazenado em vacúolos.

O Ni origina uma maior intensidade de stresse oxidativo na planta adulta por comparação com a planta jovem. Em folhas novas, os mecanismos de resposta das plantas não são eficientes



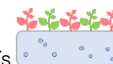
em neutralizar o efeito tóxico da presença de níquel que resulta num aumento dos níveis de  $H_2O_2$  e no aparecimento de danos oxidativos nas células. A exposição a 50 e 125  $\mu M$  resulta na ativação de várias reações do metabolismo secundário, nomeadamente, um aumento a atividade da PAL, com a consequente síntese de antocianinas, assim como em mecanismos enzimáticos (CAT, 50  $\mu M$ ; POD, 125  $\mu M$ ) e não-enzimáticos (ASA, GSH).

Nas folhas velhas, como seria de esperar, esta intensidade do stresse é superior havendo a síntese de compostos fenólicos, a ativação de mecanismos enzimáticos (CAT, POD, 50  $\mu M$ ; SOD, POD, GR, 125  $\mu M$ ) bem como a produção de ASA. Estes resultados estão concordantes com os níveis de stresse resultantes das quantidades de Ni acumuladas nas folhas novas e velhas.

Na raiz, a exposição a 50  $\mu M$  não provoca o aparecimento de danos oxidativos nem aumentos nos níveis de peróxido de hidrogénio, provavelmente devido à atividade da POD que controla estes níveis e porque parte do níquel acumulado provavelmente se encontra retido nas raízes na forma de quelatos ou está ligado às paredes celulares, sendo posteriormente armazenado em vacúolos, neutralizando o seu efeito. Nas plantas contaminadas com 125  $\mu M$ , existe uma resposta mais intensa da planta com a ativação de mecanismos enzimáticos (CAT, POD, APX) e não-enzimáticos (ASA) mas que não são eficientes em evitar a ocorrência de danos. Este comportamento está relacionado com o facto de na planta adulta a quantidade de Ni acumulada ser bastante superior à obtida na planta jovem, o que já desencadeia uma resposta mais intensa na planta.

Na planta jovem, a resposta da planta baseia-se no aumento da atividade enzimática de PAL, e no aumento da síntese de compostos fenólicos e antocianinas, que são eficazes no controlo do nível de stresse oxidativo induzido pela presença de níquel (50, 125  $\mu M$ ; 2 dias de exposição), tanto em folhas como na raiz.

Na planta adulta, a presença de diferentes concentrações de níquel permite ativar mecanismos de resposta enzimática e não-enzimática, em folhas e raiz, mas que não são eficientes no controlo dos níveis de stresse induzido nestas condições experimentais (50, 125  $\mu M$ ; 20 dias de exposição). Nas plantas de alface contaminadas com este elemento, tanto a folha como a raiz, são afetadas pela presença de níquel.

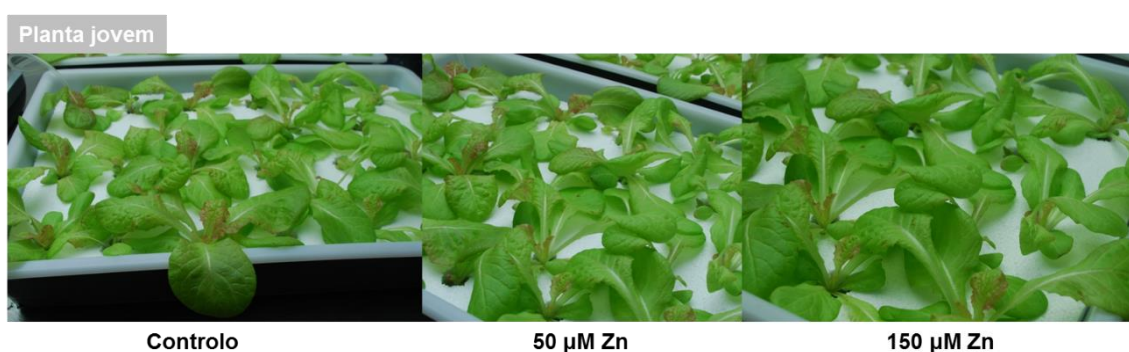


### 5.4.5. Zinco

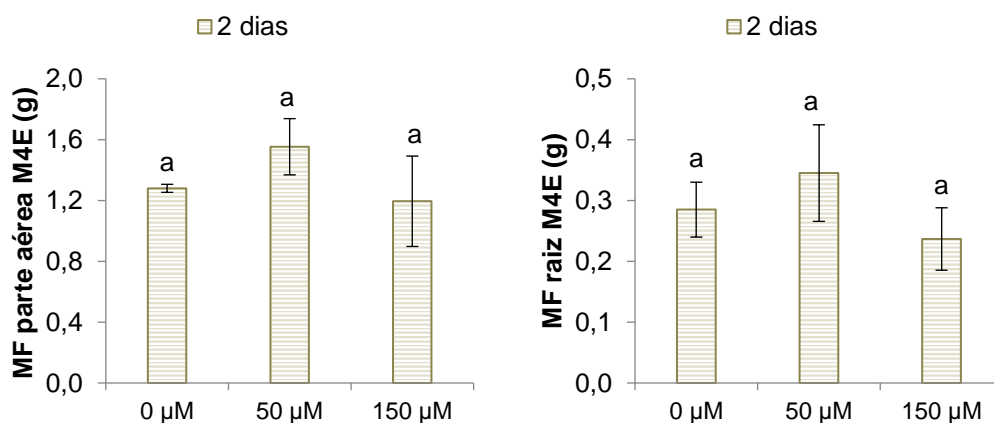
#### 5.4.5.1. Planta jovem

##### 5.4.5.1.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Zn

Na **Figura 5.54** encontra-se o registo fotográfico efetuado para as diferentes modalidades em estudo após de 2 dias de contaminação com Zn. Na **Figura 5.55** encontram-se os resultados obtidos para a massa fresca, da parte aérea e da raiz, da planta jovem.

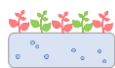


**Figura 5.54** – Registo fotográfico da planta jovem de alface M4E ao 2º dia de exposição com Zn.



**Figura 5.55** – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas jovens de alface M4E ao fim de 2 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controlo), 50 e 150 µM de Zn.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controlo ( $n=3$ ).



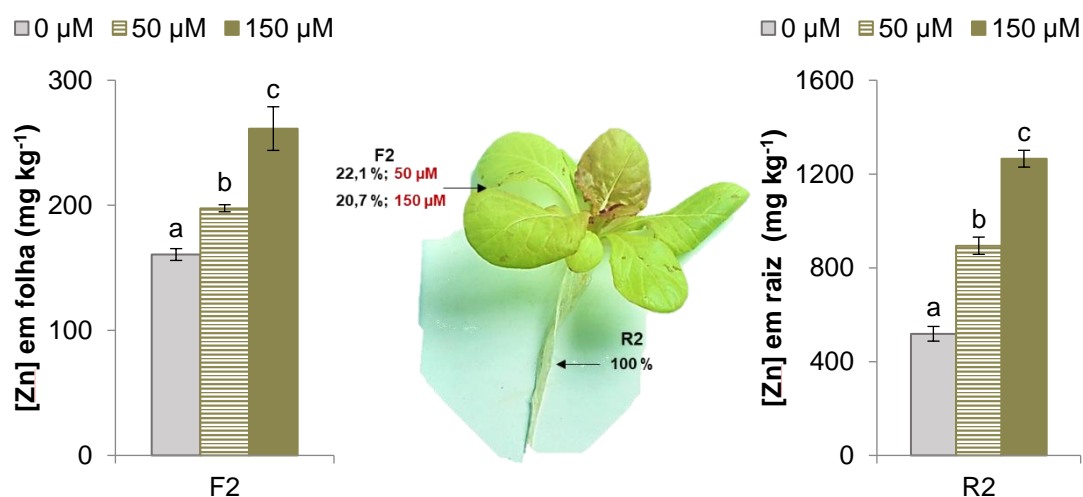
Na planta jovem, não se observam sintomas visíveis de toxicidade na parte aérea e na raiz, entre as plantas controlo e as plantas contaminadas com Zn (50, 150  $\mu$ M) durante este período de tempo (2 dias de contaminação).

Este comportamento está de acordo com os resultados obtidos para a massa fresca da parte aérea e da raiz, onde não se verificam diferenças significativas entre as plantas contaminadas com zinco e as plantas controlo. Nestas condições de ensaio, o crescimento da planta aparentemente não é afetado.

No presente trabalho calcularam-se os valores médios das percentagens de humidade para a biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controlo, considerando-se a exposição ao fim de 2 dias com 50 e 150  $\mu$ M de Zn. Verifica-se que não existem grandes variações nos teores de água obtidos nas plantas controlo (parte aérea: 95,8 %; raiz: 94,8 %) em relação às plantas contaminadas com 50  $\mu$ M (parte aérea: 95,5 %; raiz: 93,4 %) e 150  $\mu$ M (parte aérea: 94,7 %; raiz: 90,0 %).

#### 5.4.5.1.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos

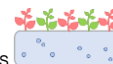
As concentrações de Zn obtidas para a folha e raiz da planta jovem de alface encontram-se apresentados na **Figura 5.56**.



**Figura 5.56** – Concentração de Zn em folha e raiz de plantas jovens de M4E ao fim de 2 dias de exposição a 50 e 150  $\mu$ M de Zn

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controlo ( $n=3$ ). Os valores indicados correspondem às percentagens de Zn nas folhas em relação à quantidade na raiz (considerada como 100 %).





É possível verificar que concentrações crescentes de Zn aplicadas no meio, resultaram numa maior quantidade de Zn acumulada nos diferentes órgãos da planta.

Apesar de se não verificarem efeitos visíveis de toxicidade na parte aérea, tal como se observa na **Figura 5.54**, a planta jovem de alface parece tolerar níveis relativamente elevados de Zn nos seus órgãos. Na F2, a exposição a 50 e 150  $\mu\text{M}$  de Zn resulta numa acumulação de  $197,64 \pm 2,83$  e  $261,36 \pm 17,44$  mg de Zn  $\text{kg}^{-1}$  MS, respetivamente. A R2 acumula  $894,41 \pm 36,87$  e  $1265,45 \pm 35,82$  mg de Zn  $\text{kg}^{-1}$  MS, quando exposta a 50 e 150  $\mu\text{M}$  de Zn, respetivamente.

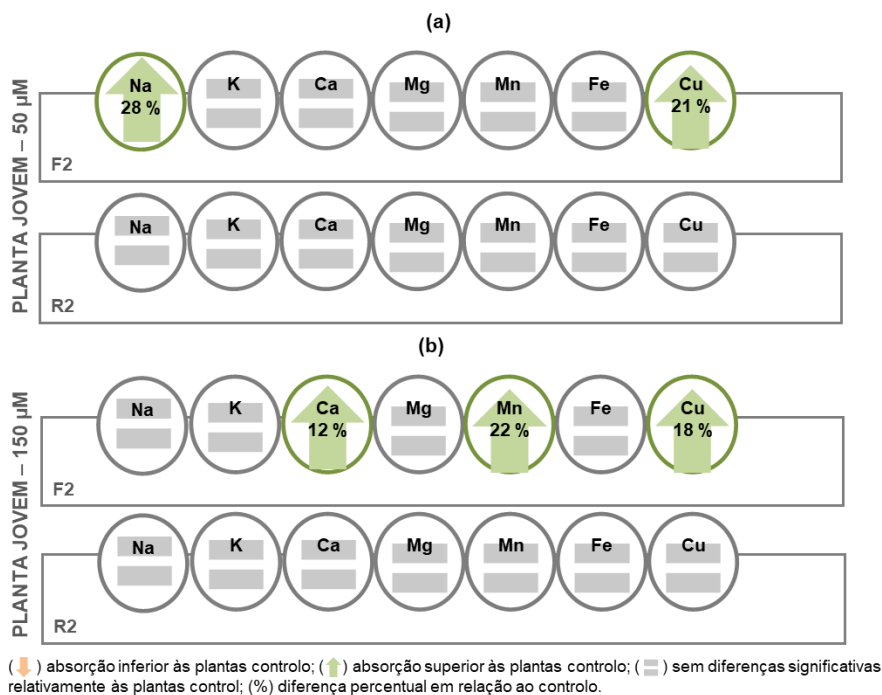
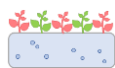
É notório que o Zn se acumula preferencialmente na raiz. Contudo, através da observação dos resultados, verifica-se que as folhas acumulam grandes quantidades de Zn nos seus tecidos, comparativamente a todos os outros EPTs estudados no presente trabalho (Cd, Cr, Pb, Ni). Isto evidencia que este elemento é bastante móvel não existindo uma grande restrição na sua entrada na planta, tal como verificado no **Capítulo IV**.

Na **Figura 5.56** também estão representadas as percentagens de Zn acumulado na parte aérea em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %), em plantas jovens contaminadas com 50 e 150  $\mu\text{M}$ . Verifica-se uma translocação para a parte aérea de 22,1 % e de 20,7 %, comparativamente à raiz, em plantas expostas a 50 e 150  $\mu\text{M}$  de Zn. Apesar de o Zn se acumular em grande quantidade na raiz, estes resultados mostram que uma quantidade razoável de Zn absorvida é translocada para a parte aérea, tal como sucede para o Ni.

Na **Figura 5.57** apresentam-se as principais tendências observadas na variação dos teores dos elementos químicos devido à presença de Zn em solução nutritiva, para a folha e raiz da planta jovem (os respetivos valores encontram-se na **Tabela B9** do **Anexo B**).

Verifica-se que o Zn não afeta negativamente a absorção de nenhum elemento químico em estudo, promovendo sempre o aumento dos seus teores na parte aérea. A exposição a 50  $\mu\text{M}$  de Zn desencadeia um aumento significativo nos teores de Na e Cu na F2, não se observando nenhum efeito na R2. Com 150  $\mu\text{M}$  de Zn observa-se um aumento nos teores de Ca, Mn e Cu e nenhum efeito na R2.

Nestas condições de ensaio, a presença de zinco promove a translocação de elementos essenciais ao crescimento da planta jovem, o que pode estar relacionado com o facto de não se observarem sintomas nas plantas.



**Figura 5.57** – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F2 e R2 ao fim de 2 dias de exposição a 50 (a) e 150 µM (b) de Zn.

#### 5.4.5.1.3. Caracterização da resposta da planta jovem

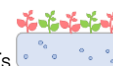
Na **Tabela 5.25** estão os resultados obtidos para os parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Zn.

##### *Folha nova – 50 e 150 µM Zn (planta jovem)*

Na F2 não se observam diferenças significativas no teor de  $H_2O_2$  e MDA nas plantas contaminadas com 50 e 150 µM de Zn, o que evidencia que, provavelmente, podem estar ativos determinados mecanismos de defesa que permitem controlar os níveis de ROS e evitar o aparecimento de danos oxidativos. Num estudo realizado por Li et al. (2013) também observaram um aumento pouco significativo nos teores de peróxido de hidrogénio em plantas de trigo, e os níveis de MDA permaneceram inalterados, após 6 dias de exposição com 3000 µM de Zn.

##### *Folha nova – 50 µM Zn (planta jovem)*

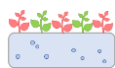
Não se observam diferenças significativas na atividade antioxidante total, o que evidencia um menor grau de stresse oxidativo.



**Tabela 5.25** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Zn.

	Unidade	F2		
		0 µM	50 µM Zn	150 µM Zn
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	319,5±64,3a	320,7±24,2a	346,5±32,9a
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,44±0,15a	0,32±0,08a	0,49±0,09a
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse				
clorofila a	µmol g <sup>-1</sup>	0,54±0,04a	0,48±0,03a	0,49±0,04a
clorofila b	µmol g <sup>-1</sup>	0,13±0,01a	0,12±0,01a	0,12±0,01a
clorofila total	µmol g <sup>-1</sup>	0,66±0,05a	0,60±0,04a	0,61±0,05a
antocianinas	µmol g <sup>-1</sup>	0,045±0,002a	0,058±0,008b	0,040±0,002a
compostos fenólicos	mg g <sup>-1</sup>	0,15±0,03a	0,22±0,04ab	0,26±0,06b
PAL	U g <sup>-1</sup>	0,21±0,04a	0,34±0,03b	0,36±0,08b
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	159,9±5,8a	211,5±30,0a	212,5±30,3a
% RSA	%	39,8±2,6a	49,2±8,7a	46,2±8,7a
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	118,9±28,0a	110,6±11,4a	99,9±10,5a
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,07±0,01ab	0,07±0,02a	0,11±0,02b
POD	U g <sup>-1</sup>	0,16±0,02a	0,18±0,03a	0,29±0,05b
APX	U g <sup>-1</sup>	2,05±0,08a	2,50±0,53ab	2,98±0,25b
GPX	U g <sup>-1</sup>	84,8±1,7a	78,8±3,3a	68,3±5,3b
GR	U g <sup>-1</sup>	0,073±0,008a	0,067±0,013a	0,051±0,003a
Metabolitos antioxidantes				
ASA	µmol g <sup>-</sup>	1,02±0,14a	1,45±0,31b	1,48±0,06b
DHA	µmol g <sup>-1</sup>	0,51±0,05a	0,31±0,01b	0,26±0,06b
ASC	µmol g <sup>-1</sup>	1,53±0,19a	1,76±0,35a	1,74±0,01a
GSH	µmol g <sup>-1</sup>	0,51±0,07a	0,22±0,05b	0,69±0,12c
GSSG	µmol g <sup>-1</sup>	0,20±0,02a	0,28±0,06ab	0,30±0,07b
TGSH	µmol g <sup>-1</sup>	0,71±0,1a	0,50±0,1a	0,99±0,4b

Os resultados são apresentados na forma média±desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.



Na F2 exposta a 50  $\mu\text{M}$ , nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse apenas se verifica um aumento na atividade da PAL e na concentração de antocianinas, apesar de não se observarem visualmente alterações na cor das folhas (**Figura 5.54**). Também não foram detetadas diferenças significativas nos teores de clorofila (a, b e total). Estes resultados indicam que não existe degradação das clorofilas mas uma indução da produção de antocianinas que são compostos antioxidantes.

Não se observam diferenças significativas no sistema antioxidante enzimático, o que pode indicar que outros mecanismos de tolerância deverão estar ativos. Relativamente aos metabolitos antioxidantes não-enzimáticos, apenas se verifica um aumento significativo do teor de ASA, indicando o seu papel fundamental nos mecanismos de defesa da planta jovem.

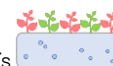
#### *Folha nova – 150 $\mu\text{M}$ Zn (planta jovem)*

Para níveis de contaminação mais elevados (F2, 150  $\mu\text{M}$ ), já ocorre uma resposta mais intensa comparativamente à concentração mais baixa aplicada. No entanto, não se observam diferenças significativas na atividade antioxidante total, relativamente às plantas controlo, apesar de existir um ligeiro aumento.

Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse verifica-se um aumento na atividade da PAL e no teor de polifenóis, sugerindo que há ativação de outras vias metabólicas envolvidas na resposta ao stresse induzido por estas condições experimentais. Os resultados também indicam que não existe degradação das clorofilas nem uma indução da produção de antocianinas.

A atividade da POD e APX aumenta de forma significativa, em relação ao controlo, indicando que estas enzimas são importantes nos mecanismos de destoxificação. No entanto, a presença de Zn origina a diminuição da atividade da GPX, e a SOD, CAT e GR aparentemente não estão envolvidas na resposta ao stresse induzido por 150  $\mu\text{M}$  de Zn. Li et al. (2013) também verificaram que na presença de Zn, as folhas de trigo expostas a 500, 1000 e 3000  $\mu\text{M}$  de Zn, durante 6 dias, não apresentaram alterações na atividade da SOD e houve um aumento da atividade da POD e APX.

A POD promove a conversão do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água, o que poderá ser uma explicação para o facto de o nível de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ser baixo na F2. Dado que esta enzima atua em diversos substratos para além do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , logo também se pode associar a sua ativação ao aumento da concentração dos compostos fenólicos verificado. Dado que também o ASA pode ser um substrato da POD,



a combinação da ação entre compostos fenólicos/ASA/POD resulta num sistema antioxidante muito eficiente (van Doorn e Ketsa, 2014).

O aumento significativo da atividade enzimática da APX sugere que esta enzima também poderá ser um mecanismo de reposta intrínseco face aos danos oxidativos induzidos por estas condições de stresse. A APX é crucial na conversão do peróxido de hidrogénio em água, usando o ascorbato como dador específico de eletrões. Isto está de acordo com o facto de a concentração de ASA aumentar de forma significativa porque, muito provavelmente, este composto está a ser regenerado a uma taxa elevada.

O teor de GSH também aumenta de forma significativa, bem como o de GSSG, sugerindo que existe uma taxa elevada na conversão entre a forma reduzida e oxidada. Estes resultados indicam um possível envolvimento da via ascorbato-glutationa no processo de tolerância.

Na **Tabela 5.26** estão os resultados obtidos para os parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Zn.

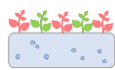
**Tabela 5.26** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R2, da planta jovem, após 2 dias de contaminação com Zn.

		R2		
	Unidade	0 µM	50 µM Zn	150 µM Zn
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	66,9±4,1a	95,1±9,5a	80,4±4,7a
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,112±0,005a	0,135±0,001ab	0,159±0,023b
Defesa Antioxidante				
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	169,2±6,4a	130,7±3,6b	201,8±13,0c
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,038±0,005a	0,050±0,002b	0,045±0,005ab
POD	U g <sup>-1</sup>	3,10±0,52a	2,89±0,29a	2,58±0,42a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,041±0,002a	0,036±0,004a	0,043±0,011a

O símbolo  $\pm$  representa o desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controlo.

#### *Raiz – 50 e 150 $\mu\text{M}$ Zn (planta jovem)*

Na R2 exposta a 50  $\mu\text{M}$  de Zn não existem diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas, apesar de existir um ligeiro aumento do teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A CAT é a única enzima que apresenta um aumento de atividade,



podendo estar ativa na remoção do teor de  $H_2O_2$  o que explica que estes valores não sejam tão elevados.

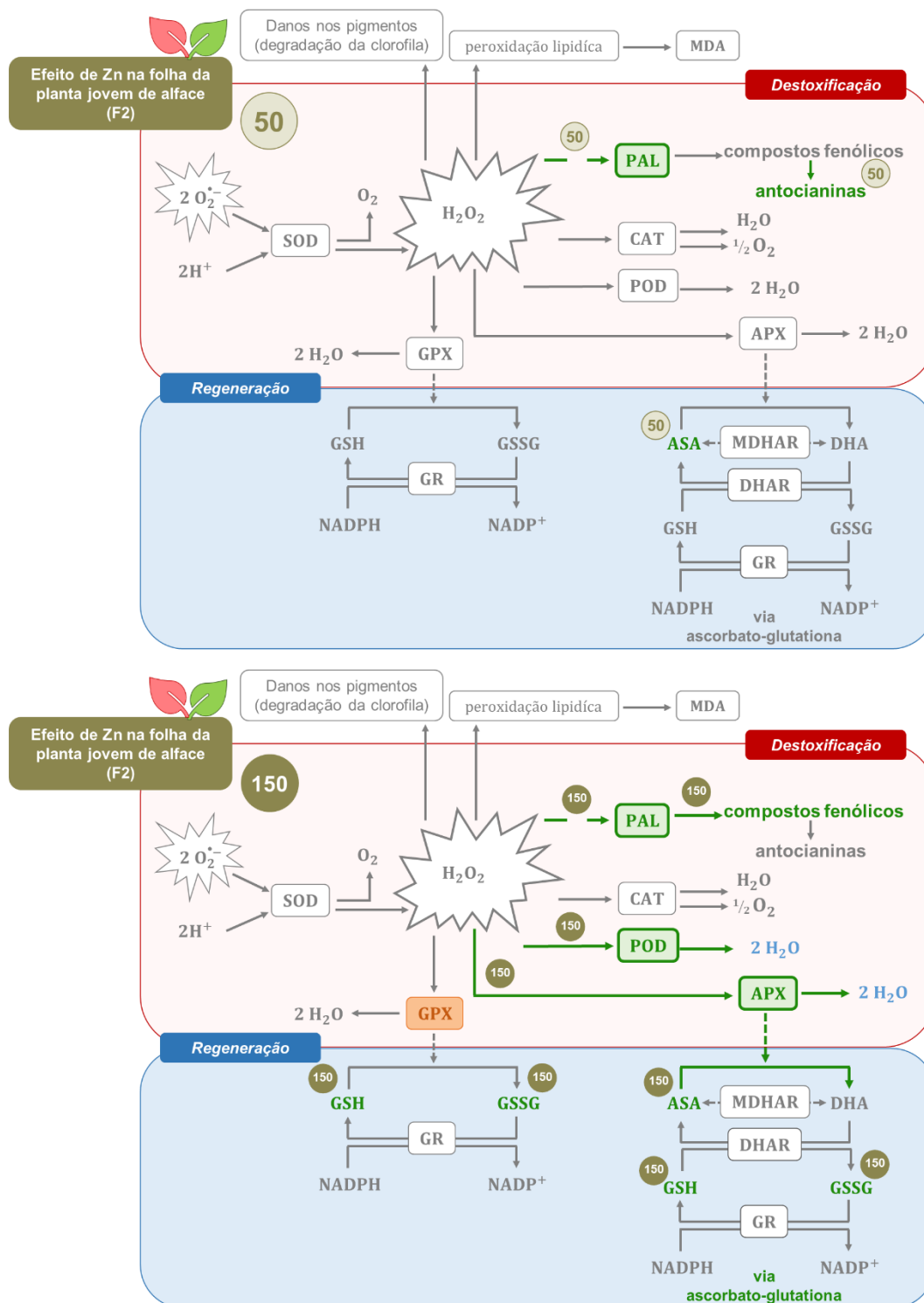
Na R2 exposta a 150  $\mu M$  de Zn verifica-se um ligeiro aumento no teor de  $H_2O_2$ , apesar de não se verificarem diferenças significativas. O nível de MDA aumenta de forma significativa indicando a ocorrência de danos oxidativos nas células. A enzima que apresenta um aumento significativo na sua atividade é a SOD. No entanto, a sua atividade não é suficiente para a eliminação completa das ROS, pois o  $H_2O_2$  resultante pode reagir com os iões metálicos, dando origem ao radical  $OH^\bullet$  que é um forte agente causador de danos oxidativos nas células.

#### **5.4.5.1.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta jovem face à toxicidade induzida por Zn**

Na planta jovem, a avaliação da resposta antioxidante de plantas expostas a Zn está representada para a folha (**Figura 5.58**) e raiz (**Figura 5.59**).

Na F2, a presença de Zn desencadeia uma resposta da planta de alface jovem que é mais acentuada para a concentração mais elevada testada. Em folhas de plantas contaminadas com 50  $\mu M$ , a resposta eficiente da planta, de forma a evitar o aparecimento de danos oxidativos nas células, resulta na ativação da PAL com a posterior síntese de antocianinas, e no aumento do teor de ASA, que atua como antioxidante não-enzimático. Nas folhas de plantas contaminadas com 150  $\mu M$ , também existe uma resposta eficiente da planta jovem que consiste na ativação de mecanismos de resposta antioxidante (POD, APX), bem como a produção de ASA e GSH, indicando estar ativa a via ascorbato-glutationa, assim como de outras reações do metabolismo secundário (PAL, compostos fenólicos).

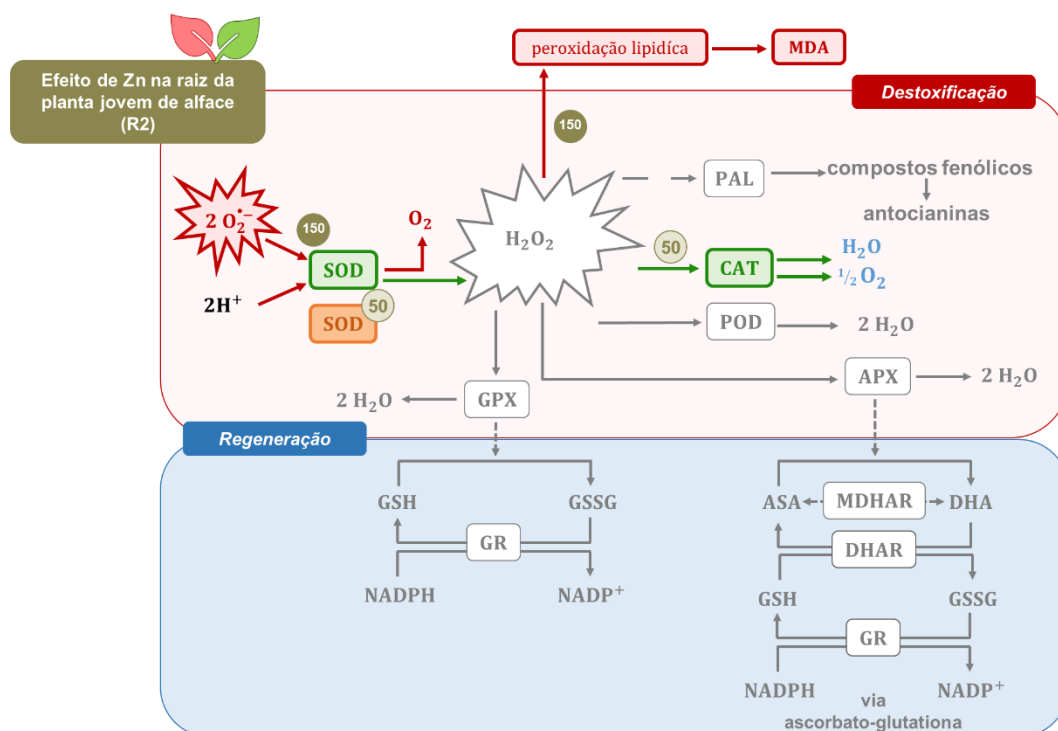
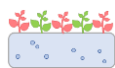
Na raiz, a resposta da planta baseia-se na ativação da CAT que é eficiente na remoção dos níveis de peróxido em excesso nas plantas contaminadas com 50  $\mu M$  de Zn, evitando o aparecimento de peroxidação lipídica. Na raiz de plantas contaminadas 150  $\mu M$ , há o aumento da atividade enzimática da SOD que origina a formação de ROS que originam danos oxidativos. Estes resultados estão concordantes com o facto de ser na raiz que se acumulam maiores quantidades de Zn e, por isso, a planta não consegue ter uma resposta eficiente face ao stress induzido por estas condições experimentais.



**Figura 5.58** – Representação esquemática da resposta antioxidante em F2 de alface M4E contaminada com 50 e 150 µM Zn (indicado na figura como 50 e 150).

A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais. A laranja estão representados os mecanismos enzimáticos que diminuem na defesa.





**Figura 5.59** – Representação esquemática da resposta antioxidante em R2 de alface M4E contaminada com 50 e 150  $\mu\text{M}$  Zn (indicado na figura como 50 e 150).

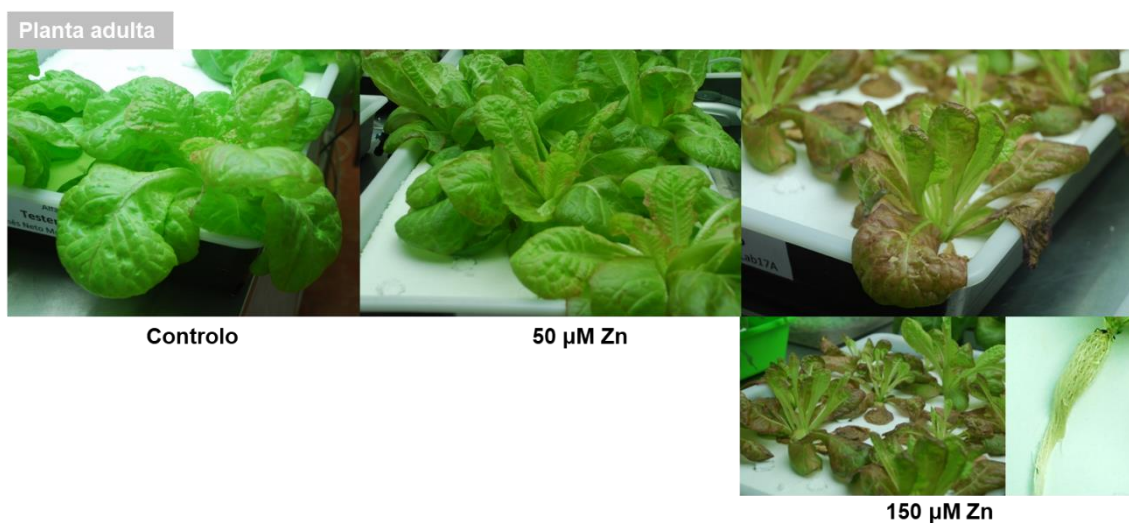
A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais. A laranja estão representados os mecanismos enzimáticos que diminuem na defesa.

#### 5.4.5.2. Planta adulta

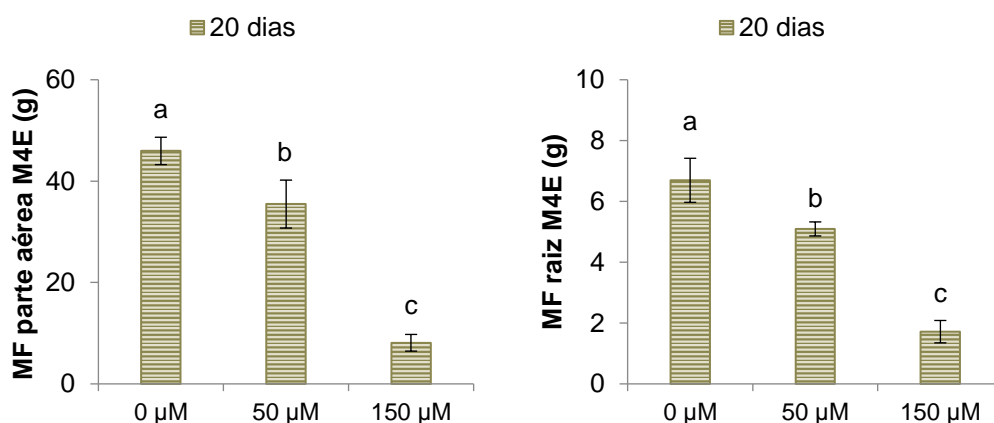
##### 5.4.5.2.1. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade induzidos pelo Zn

Na **Figura 5.60** encontra-se o registo fotográfico das plantas controlo e contaminadas durante 20 dias de exposição a 50 e 150  $\mu\text{M}$  de Zn. Na **Figura 5.61** apresentam-se os resultados obtidos para a massa fresca, da parte aérea e da raiz, da planta adulta.

Visualmente, verifica-se uma diminuição do tamanho das plantas, nomeadamente, da parte aérea e raiz, com o aumento da concentração de Zn adicionada em solução nutritiva. Nas plantas contaminadas com 150  $\mu\text{M}$  de Zn, os sintomas visíveis de toxicidade são mais intensos, verificando-se o aparecimento de uma coloração avermelhada, que não se deteta visualmente na outra concentração mais baixa aplicada.



**Figura 5.60** – Registro fotográfico da planta adulta de alface M4E ao 20º dia de exposição com Zn.

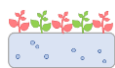


**Figura 5.61** – Massa fresca da parte aérea e da raiz de plantas adultas de alface M4E ao fim de 20 dias de crescimento em solução nutritiva com 0 (controle), 50 e 150 µM de Zn.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ).

As folhas velhas apresentam-se mais murchas e com menor vigor comparativamente às folhas novas e as raízes ficam amareladas. Estes sintomas visíveis de toxicidade, característicos de plantas contaminadas com zinco, já foram referidos em pormenor no **Capítulo IV**.

Neste tempo de exposição (20 dias), o crescimento da planta é afetado. Na planta adulta, existe uma diminuição significativa e gradual na massa fresca da parte aérea e raiz entre plantas contaminadas (50, 150 µM) e controle. Esta diminuição da biomassa das plantas com o aumento da concentração de zinco no meio externo também foi verificado também por



outros autores em brássicas (0,05, 500  $\mu\text{M}$ ; 21 dias) (Blasco et al., 2015) e em beterraba (50, 100, 300  $\mu\text{M}$ ; 9-10 dias) (Sagardoy et al., 2009). Prasad et al. (1999) observaram que 50  $\mu\text{M}$  de Zn promoveu o crescimento das plantas de *Brassica juncea*, no entanto, concentrações de 5000 e 10000  $\mu\text{M}$  levaram a uma diminuição significativa do crescimento.

Através da observação dos gráficos é possível verificar que tanto a parte aérea como a raiz são bastante afetadas em termos de biomassa para as duas contaminações aplicadas, sendo esse efeito maior para a concentração mais elevada estudada. Se se calcular os valores relativos à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controlo, é possível confirmar este efeito. No caso da contaminação com 50  $\mu\text{M}$  existe uma diminuição de 22,8 % na parte aérea, e de 23,9 % na raiz. Com a exposição a 150  $\mu\text{M}$ , verifica-se uma diminuição superior de 82,4 % e de 74,4 %, para a parte aérea e raiz, respetivamente.

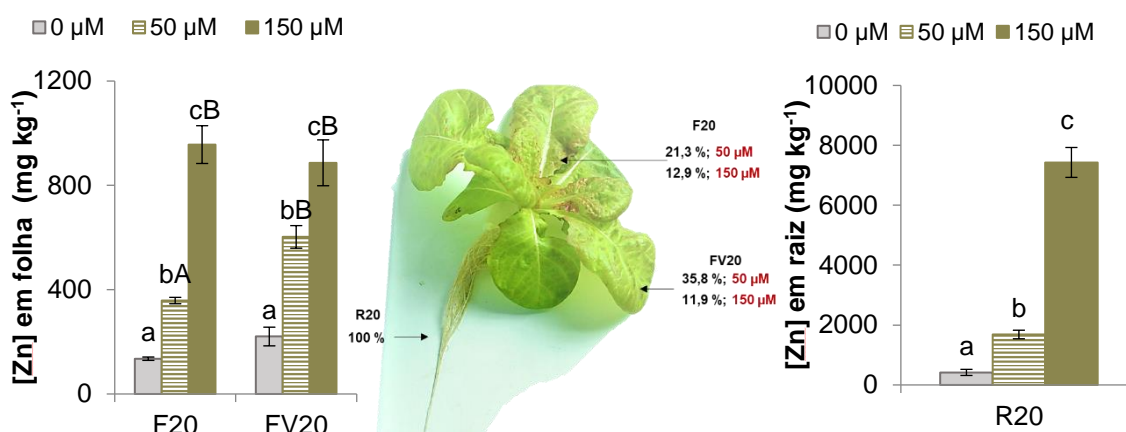
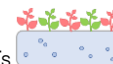
No presente trabalho calcularam-se os valores médios das percentagens de humidade para a biomassa da parte aérea e da raiz, comparativamente ao controlo, considerando-se a exposição ao fim de 20 dias com 50 e 150  $\mu\text{M}$  de Zn. Verifica-se que existe uma ligeira tendência para uma diminuição no teor de água das plantas controlo (parte aérea: 96,9 %; raiz: 96,3 %) em relação às plantas contaminadas com 50  $\mu\text{M}$  (parte aérea: 96,3 %; raiz: 92,3 %) e 15  $\mu\text{M}$  (parte aérea: 76,6 %; raiz: 86,0 %). A diminuição da biomassa verificada pode estar relacionada com a alteração do balanço hídrico, pois o Zn parece interferir com a absorção de água, tal como verificado no **Capítulo IV**.

#### 5.4.5.2.2. Caracterização da acumulação de elementos químicos

Na **Figura 5.62** apresentam-se os resultados obtidos para a acumulação de Zn na planta adulta.

Há uma tendência para uma maior acumulação de Zn nas folhas e raiz, que está relacionada com o aumento na quantidade de Zn em solução nutritiva.

A exposição a Zn resulta numa acumulação bastante superior na R20, em relação à obtida em folhas, de  $1684,46 \pm 143,89 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$  (50  $\mu\text{M}$ ) e  $7429,23 \pm 499,29 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$  (150  $\mu\text{M}$ ), respetivamente. Com a exposição a 50  $\mu\text{M}$  de Zn, na F20 há uma acumulação de  $358,31 \pm 12,29 \text{ mg de Zn kg}^{-1} \text{ MS}$  e na FV20 esta quantidade acumulada duplica,  $602,40 \pm 43,23 \text{ mg de Zn kg}^{-1} \text{ MS}$ . A presença de 150  $\mu\text{M}$  de Zn, leva a uma acumulação, na F20, de  $956,32 \pm 72,44 \text{ mg de Zn kg}^{-1} \text{ MS}$ , que apesar de superior é muito semelhante à obtida na FV20,  $886,41 \pm 87,89 \text{ mg de Zn kg}^{-1} \text{ MS}$ .



**Figura 5.62** – Concentração de Zn em folhas e raiz de plantas adultas de M4E ao fim de 20 dias de exposição a 50 e 150 µM de Zn.

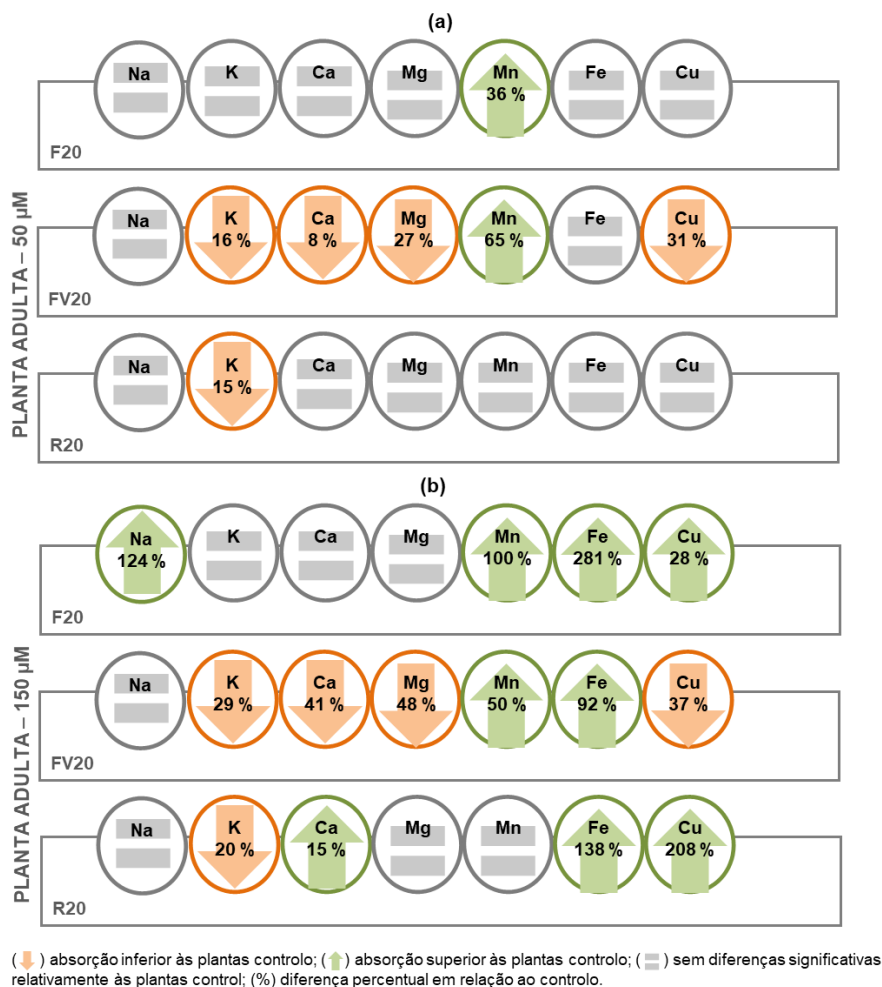
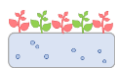
As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada nível de contaminação e o controle ( $n=3$ ). As letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre F20 e FV20. Os valores indicados correspondem às percentagens de Zn nas folhas em relação à quantidade na raiz (considerada como 100 %).

Na **Figura 5.62** apresentam-se as percentagens de Zn acumulado em plantas adultas na parte aérea, em relação à quantidade presente na raiz (considerada como 100 %). Estes valores indicam que uma parte importante do Zn absorvida pela raiz é translocada para a parte aérea da planta de alface. Com a exposição a 50 µM de Zn, há uma translocação de 21,3 % (F20) e na FV20 este valor percentual aumenta, 35,8 %, tal como acontece na quantidade de Zn acumulada nos tecidos. A presença de 150 µM de Zn leva a uma translocação de valores percentuais muito semelhantes na F20 (12,9 %) e FV20 (11,9 %), tal como se verifica para os valores acumulados do elemento.

Na **Figura 5.63** encontram-se as principais tendências observadas na variação dos teores dos elementos químicos devido à presença de Zn em solução nutritiva (os respetivos valores encontram-se na **Tabela B10**).

Uma quantidade excessiva de Zn durante um período mais prolongado tem influência na absorção de outros elementos químicos, em particular na folha.

A exposição a 50 µM de Zn resulta num estímulo da absorção de Mn, tanto na F20 como na FV20. Na R20, a presença de Zn apenas afeta negativamente a absorção de K. Na FV20, afeta a absorção de K, Ca, Mg e Cu.

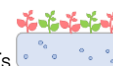


**Figura 5.63** – Esquema representativo da variação obtida na concentração de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) em F20, R20 e FV20 ao fim de 20 dias de exposição a 50 (a) e 150  $\mu\text{M}$  (b) de Zn.

A exposição a 150  $\mu\text{M}$  de Zn desencadeia um grande estímulo principalmente na absorção de Na, Mn e Fe, havendo também uma acumulação significativa de Cu, na F20. Na FV20, a resposta da planta é semelhante à obtida na FV20 exposta a 50  $\mu\text{M}$ , havendo apenas um aumento significativo adicional no teor de Fe. Na R20, continua a existir uma diminuição na absorção de K, mas que é acompanhado por um aumento da absorção de Ca, Fe e Cu.

A presença de Zn parece ter bastante interferência (valores percentuais bastante elevados relativamente ao controle) na absorção de Fe e Cu, favorecendo a sua entrada pela raiz, e na posterior translocação de Mn para a parte superior da planta. Este comportamento deve ocorrer porque todos estes elementos apresentam propriedades químicas semelhantes.

Siedlecka (1995) referiram que o Zn e o Fe são antagonistas, apesar de o Zn afetar mais a translocação de Fe que a sua absorção. O Zn tem um efeito regulatório na absorção de Fe.



Níveis tóxicos de Zn induzem deficiências em ferro devido à competição entre eles e à interação Fe-Zn, que é explicada pelo raio iônico semelhante, por serem catiões divalentes e pelos mecanismos regulatórios das células. No entanto, também se tem observado que em plantas contaminadas com Zn pode ocorrer um aumento dos níveis de Fe presentes nos seus tecidos, provavelmente por uma diminuição nos teores de Zn translocados para a parte aérea (Li et al., 2015). Existem outras interações importantes entre nutrientes, como a interação Fe-Mn, o que em parte explica os resultados obtidos no presente estudo com as plantas de alface (Castaings et al., 2016).

As alterações nos teores de potássio podem resultar em alterações na razão K/Ca, o que pode ter um impacto no balanço hídrico, e esta poderá ser uma explicação para os teores de água diminuírem, tal como verificado para as plantas contaminadas com zinco. Esta diminuição nos teores de K pode estar também relacionada com danos na permeabilidade das membranas das células das raízes e à perda de íons  $K^+$  que promove a difusão de outros íons ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) para dentro das raízes (DalCorso et al., 2010).

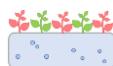
#### 5.4.5.2.3. Caracterização da resposta da planta adulta

Nas **Tabelas 5.27, 5.28 e 5.29**, são apresentados os resultados obtidos para as F20, R20 e FV20 da planta adulta após 20 dias de contaminação com Zn.

##### *Folha nova – 50 $\mu M$ Zn (planta adulta)*

Na F20 exposta a 50  $\mu M$  de Zn não se observam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas, nem nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse. Estes resultados evidenciam que para estas condições experimentais há um menor grau de stresse oxidativo nas plantas, que são compatíveis com os níveis baixos de peróxido de hidrogénio.

É possível verificar um aumento da atividade antioxidante total, indicando que um sistema antioxidante está ativo. Os mecanismos antioxidantes enzimáticos têm um papel fundamental face à toxicidade induzida por esta concentração de zinco, havendo um aumento significativo na atividade enzimática da GPX e esta enzima compete com a CAT pelo  $H_2O_2$ , daí a atividade da CAT diminuir de forma significativa, comparativamente ao controlo. A GPX apresenta um papel fundamental nos mecanismos de defesa face ao stresse promovido por estas condições. Não se observam diferenças significativas na concentração de ASA e GSH, indicando que estes metabolitos não estão a ser regenerados para a eliminação das ROS.

**Tabela 5.27** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na F20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Zn.

		F20		
	Unidade	0 µM	50 µM Zn	150 µM Zn
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	176,7±43,7a	296,8±62,4a	863,8±160,2b*
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,37±0,02a	0,40±0,03a	1,33±0,20b*
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse				
clorofila a	µmol g <sup>-1</sup>	0,53±0,01ab	0,58±0,02a*	0,48±0,04b
clorofila b	µmol g <sup>-1</sup>	0,133±0,003a	0,157±0,004b*	0,129±0,011a
clorofila total	µmol g <sup>-1</sup>	0,66±0,02ab	0,73±0,03a*	0,61±0,05b
antocianinas	µmol g <sup>-1</sup>	0,043±0,001a	0,124±0,033ab*	0,220±0,077b*
compostos fenólicos	mg g <sup>-1</sup>	0,12±0,03a	0,30±0,12a	1,00±0,27b*
PAL	U g <sup>-1</sup>	0,23±0,04a	0,28±0,04a	0,56±0,13b
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	121,3±19,0a*	247,8±73,0a	441,2±92,7b*
% RSA	%	32,9±0,4a	54,3±11,1b	91,0±0,2c
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	117,9±24,5a	122,1±24,0a	365,8±55,4b*
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,22±0,06a*	0,10±0,02b	0,27±0,07a*
POD	U g <sup>-1</sup>	0,31±0,03a	0,34±0,01a*	1,51±0,10b*
APX	U g <sup>-1</sup>	0,87±0,08a*	1,14±0,10a*	4,45±0,38b*
GPX	U g <sup>-1</sup>	82,7±2,1a	126,0±6,6b*	124,1±8,4b*
GR	U g <sup>-1</sup>	0,13±0,01a*	0,09±0,01b*	0,04±0,01c*
Metabolitos antioxidantes				
ASA	µmol g <sup>-1</sup>	0,64±0,07a*	0,90±0,08a*	1,47±0,26b
DHA	µmol g <sup>-1</sup>	0,27±0,01a*	0,65±0,10b*	1,41±0,22c*
ASC	µmol g <sup>-1</sup>	0,91±0,21a*	1,55±0,56b	2,88±0,37b*
GSH	µmol g <sup>-1</sup>	0,22±0,04a	0,34±0,08a	1,97±0,35b*
GSSG	µmol g <sup>-1</sup>	0,31±0,05a	0,28±0,05a	0,33±0,06a
TGSH	µmol g <sup>-1</sup>	0,53±0,1a	0,62±0,1a	2,30±0,2b

Os resultados são apresentados na forma média±desvio padrão; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.





**Tabela 5.28** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na R20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Zn.

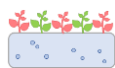
	Unidade	R20		
		0 µM	50 µM Zn	150 µM Zn
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	µg g <sup>-1</sup>	28,5±2,4a*	33,3±1,2a*	99,0±19,4b
MDA	µM g <sup>-1</sup>	0,10±0,02a	0,10±0,02a*	0,23±0,03b*
Defesa Antioxidante				
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	127,0±2,3a*	102,6±13,9a*	103,7±16,6a*
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,011±0,003a*	0,011±0,001a*	0,012±0,005a*
POD	U g <sup>-1</sup>	1,36±0,11a*	1,15±0,06a*	4,29±1,83b
APX	U g <sup>-1</sup>	1,05±0,18a	0,96±0,05a	0,91±0,05a
GR	U g <sup>-1</sup>	0,045±0,007a	0,035±0,005a	0,005±0,001b*
Metabolitos antioxidantes				
ASA	µmol g <sup>-1</sup>	0,31±0,03a	0,35±0,03a	0,61±0,06b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.

**Tabela 5.29** – Parâmetros utilizados na caracterização da resposta na FV20, da planta adulta, após 20 dias de contaminação com Zn.

		FV20		
	Unidade	0 μM	50 μM Zn	150 μM Zn
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	μg g <sup>-1</sup>	329,2±98,4a	421,3±86,6ab	720,1±201,4b
MDA	μM g <sup>-1</sup>	0,30±0,01a	0,58±0,10a	3,10±0,84b
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse compostos fenólicos				
	mg g <sup>-1</sup>	0,12±0,01a	0,60±0,20b	1,67±0,10c
Defesa Antioxidante				
Atividade antioxidante total				
TEAC	mM g <sup>-1</sup>	97,9±8,5a	357,6±19,8b	517,8±19,0c
% RSA	%	27,0±3,6	82,1±5,5b	88,2±0,6b
Enzimas antioxidantes				
SOD	U g <sup>-1</sup>	139,7±14,4a	235,8±15,9a	462,7±140,4b
CAT	U g <sup>-1</sup>	0,012±0,003a	0,040±0,006a	0,415±0,038b
POD	U g <sup>-1</sup>	0,08±0,01a	0,17±0,01a	0,77±0,12b
APX	U g <sup>-1</sup>	0,813±0,182a	1,011±0,004a	4,350±0,499b
GR	U g <sup>-1</sup>	0,035±0,003a	0,020±0,001a	n.d.
Metabolitos antioxidantes				
ASA	μmol g <sup>-1</sup>	1,29±0,02a	1,75±0,07b	4,45±0,20c

O símbolo  $\pm$  representa o desvio padrão; n.d. significa não detetado; O \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a planta jovem e adulta; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, de dada variável, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, de dada variável, em relação ao controle.

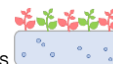
*Folha nova – 150 µM Zn (planta adulta)*

Na F20 exposta a 150 µM de Zn há um aumento muito significativo do teor de  $H_2O_2$  e existe o indício de ocorrência de danos oxidativos, uma vez que o nível de MDA aumenta de forma significativa indicando que está a ocorrer a peroxidação lipídica. Em plantas de *Lactuca sativa*, exposta a 500 µM durante 21 dias, a acumulação de Zn resultou num aumento das ROS (Barrameda-Medina et al., 2014). Blasco et al. (2015) verificaram que um excesso de Zn (500 µM) levou a um aumento acentuado nos teores de MDA e  $H_2O_2$  em plantas de *Brassica rapa*. Resultados semelhantes foram obtidos em feijão (Michael e Krishnaswamy, 2011), *Brassica napus* (Ben Ghnaya et al., 2009), *Lemna gibba*, *Lemna minor* e *Spirodela polyrrhiza* (Parlak e Yilmaz, 2012).

A atividade antioxidante total aumenta de forma bastante significativa para estas condições de stresse, indicando que há um elevado grau de stresse oxidativo nas plantas. Relativamente aos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse existe um aumento da atividade da PAL que está ativa na produção de antocianinas (tal como verificado visualmente, **Figura 5.60**) e no teor de polifenóis totais, existindo a ativação de reações específicas relacionadas com o metabolismo secundário. Mishra e Prakash (2010) também referiram que a presença de zinco (500, 1000, 2000 µM; 5 dias) originou a ativação deste tipo de reações em plantas de *Glycine max*, ocorrendo um aumento nos teores de compostos fenólicos em plantas sujeitas ao stresse induzido por este elemento.

Existe um aumento significativo na atividade da SOD que atua na eliminação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$ , este aumento está, frequentemente, relacionado com o aumento da tolerância da planta. A SOD existente consegue controlar os níveis de  $O_2^{\bullet-}$  no meio celular, mesmo em situações de stresse, pelo que esta não é uma forma de ROS com tendência a uma acumulação. Pelo contrário, a atividade da SOD pode gerar excesso de  $H_2O_2$  que será posteriormente eliminado pelas peroxidases, POD, APX e GPX, o que se pode aqui comprovar dado que se verifica um aumento significativo na atividade destas enzimas comparativamente ao controlo.

Este aumento na atividade da SOD também foi observado por outros autores em plantas contaminadas com zinco (Blasco et al., 2015; Michael e Krishnaswamy, 2011). Barrameda-Medina et al. (2014) referiram que a atividade da SOD em *Lactuca sativa* contaminada com 500 µM de Zn diminuiu comparativamente às plantas controlo. No entanto, em *Brassica oleracea* existiu um aumento acentuado na atividade desta enzima devido à toxicidade induzida por Zn. Nas plantas, o maior sistema antioxidante envolve a ação da SOD, APX e



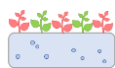
CAT. Estas enzimas são cruciais na diminuição do impacto do stresse oxidativo nas células. Quando ocorre uma alteração no balanço de alguma destas enzimas, ocorre a indução de outros mecanismos de defesa (Apel e Hirt, 2004).

No entanto, não se observam diferenças significativas na atividade da CAT indicando que esta enzima não está envolvida na defesa antioxidante. Isto deve-se, possivelmente, ao facto de a CAT não necessitar diretamente de equivalentes redutores para exercer o seu papel, pelo que é menos sensível ao estado redutor das células (Mittler, 2002), logo a sua função pode não ser afetada durante o stresse promovido por esta concentração de Zn, ao contrário de outros mecanismos. Uma alternativa à eliminação do  $H_2O_2$  é a atuação das peroxidases que apresenta uma maior afinidade para este substrato do que a CAT. As PODs podem utilizar como agente redutor diversos fenóis aromáticos (Halliwell, 2006), o que pode explicar o aumento do teor de polifenóis totais verificado. Neste caso, a ação combinada de ASA/POD/compostos fenólicos também poderá estar a formar um sistema antioxidante para combater o stresse induzido por estas condições experimentais.

A APX apresenta uma elevada afinidade para o substrato  $H_2O_2$ , relativamente à CAT e POD. Este tipo de peroxidase catalisa a conversão do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  usando o ASA como dador específico de eletrões. Sbartaí et al. (2012) também referiram um aumento na atividade da APX em tomate exposto a diferentes concentrações de Zn (50, 100, 250, 500  $\mu M$ ). Outros autores também observaram o aumento na atividade da APX em plantas contaminadas com zinco (Michael e Krishnaswamy, 2011; Mishra e Prakash, 2010; Radić et al., 2010).

O ASA também pode atuar na eliminação do  $O_2^{\bullet -}$  e  $H_2O_2$ , dando origem ao monodesidroascorbato (MDHA) e ao desidroascorbato (DHA). Cuypers et al. (2001) referiram que os níveis de ascorbato foram afetados pela presença de stresse oxidativo induzido por Zn. Os autores verificaram um aumento na oxidação do ascorbato relacionando isso com o funcionamento da via ascorbato-glutationa.

A GPX também continua a atuar nestas condições de stresse, havendo um aumento significativo na sua atividade enzimática, em relação às plantas não contaminadas. Esta peroxidase também promove a remoção do peróxido, tendo como substrato a GSH. Barrameda-Medina et al. (2014), em *Brassica oleracea*, verificaram que ocorreu um estímulo na produção de GSH, parecendo ser um metabolito crucial na tolerância da planta face ao Zn. Di Baccio et al. (2005) também referiram que a GSH é crucial na defesa da planta face ao stresse induzido por Zn (1000, 5000, 10000  $\mu M$ ; 5 semanas). Este aumento significativo nos



teores de ASA e GSH, em relação às plantas controlo, podem estar relacionadas com o funcionamento da via ascorbato-glutationa (tal como se verifica para a F2, na planta jovem).

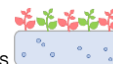
Vários autores obtiveram resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho, para as plantas de alface expostas a 150  $\mu\text{M}$  de Zn. Parlak e Yilmaz (2012) sugeriram que o combate ao stresse ocorreu devido à atividade da SOD, CAT, POD, APX e GPX cujas atividades enzimáticas aumentaram, com o aumento dos níveis Zn testados (0,2; 0,8; 1,5; 8; 23  $\mu\text{M}$ ) ao fim de 4 dias de exposição, em 3 espécies de lentilhas. Radić et al. (2010) observaram um aumento na atividade da SOD e peroxidases, havendo, no entanto, uma diminuição na atividade da CAT, em plantas de lenteinhas expostas durante 15 dias, a 150 e 300  $\mu\text{M}$  de Zn. Prasad et al. (1999) referiram que na presença de níveis tóxicos de Zn (7, 50, 5000, 10000  $\mu\text{M}$ ; 10 dias) existiu o aumento na atividade da SOD, CAT, POD, APX e GR, bem como um aumento significativo do ASA e GSH, em plântulas de *Brassica juncea*. Zhao et al. (2012) observaram um aumento nas atividades da APX e GPX, e uma diminuição na atividade da SOD e CAT, em plantas de *Phytolacca americana* expostas durante 7 dias a 2000  $\mu\text{M}$  de Zn.

É importante referir que apesar do aumento nos teores de compostos fenólicos, antocianinas, PAL, dos mecanismos enzimáticos (SOD, POD, APX, GPX) e não-enzimáticos (ASA, GSH), a resposta da planta não é eficiente para controlar os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e evitar o aparecimento de danos oxidativos nas células.

#### *Folha velha – 50 e 150 $\mu\text{M}$ Zn (planta adulta)*

Na FV20 exposta a 50  $\mu\text{M}$  de Zn há um aumento na atividade antioxidante total comparativamente ao controlo. No entanto, não se verificam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas. Ao contrário do que ocorre na F20, não existe a ativação de nenhuma enzima antioxidante. O nível de stresse oxidativo presente parece ser controlado através da atuação do ASA, pois ocorre o seu aumento significativo para estas condições de stresse. Por outro lado, também são ativados outros mecanismos do metabolismo secundário que conduzem ao aumento dos compostos fenólicos presentes.

Na FV20 contaminada com 150  $\mu\text{M}$  de Zn existe um aumento muito significativo dos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e MDA, tal como ocorre para as F20. A atividade antioxidante total aumenta de forma significativa, comparativamente ao controlo. Existe um aumento significativo da atividade da SOD que está ativa na conversão do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em peróxido, que é, posteriormente, removido pela CAT, POD e APX. Os níveis mais elevados na atividade enzimática da APX sugerem que esta



enzima é importante na destoxificação nesta parte da planta, relativamente às plantas controlo, usando como substrato o ASA.

#### *Raiz – 50 e 150 $\mu\text{M}$ Zn (planta adulta)*

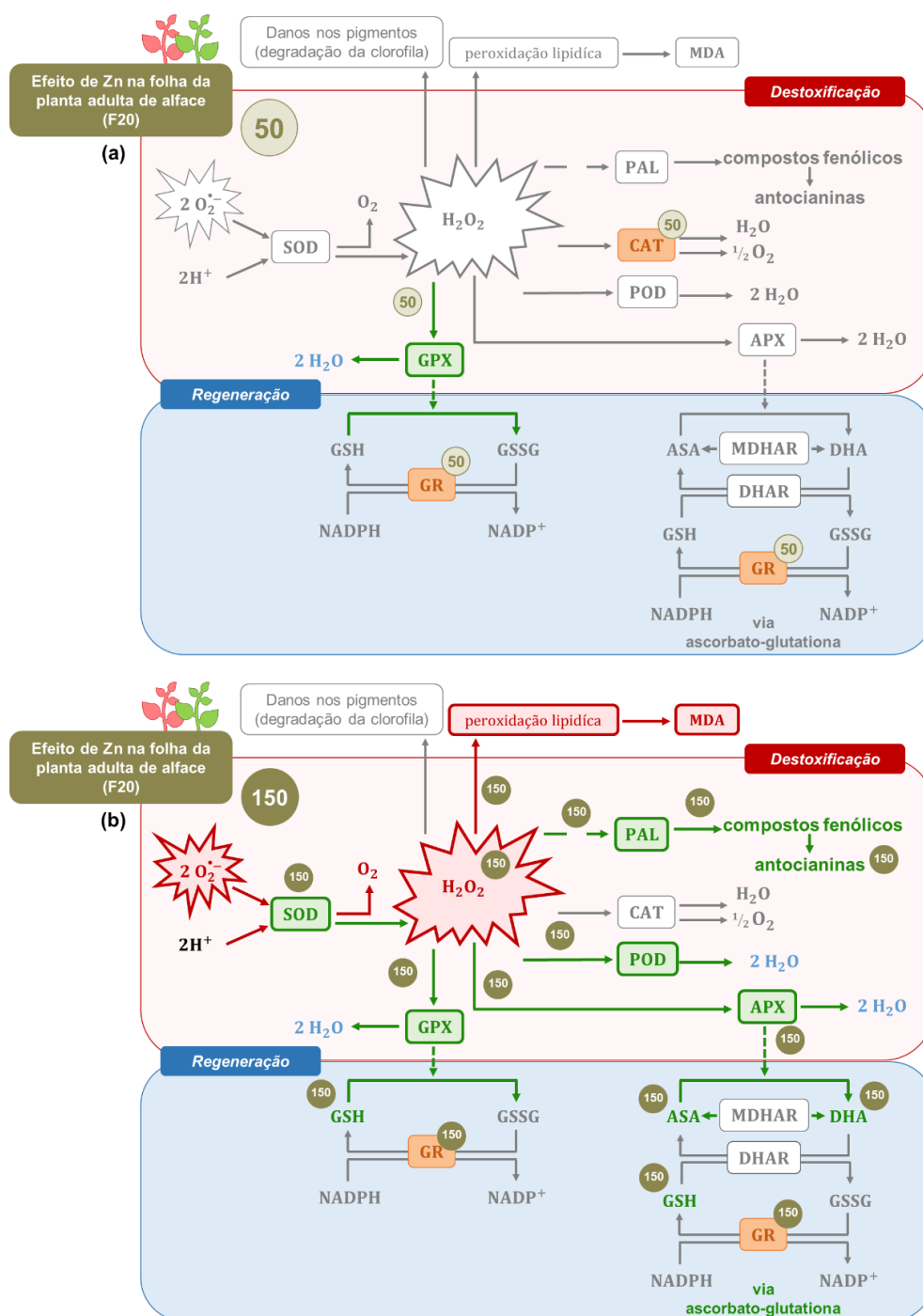
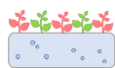
Na R20 exposta a 50  $\mu\text{M}$  de Zn não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas, nem na defesa antioxidante, nomeadamente na atividade das enzimas e metabolitos antioxidantes não-enzimáticos. Uma explicação para estes resultados é uma possível retenção de Zn nas paredes celulares ou a formação de quelatos, sendo posteriormente armazenado em vacúolos na raiz, reduzindo deste modo o seu efeito prejudicial.

Na R20 contaminada com 150  $\mu\text{M}$  de Zn já existe um aumento dos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e MDA indicando a existência de stresse oxidativo e danos oxidativos nas membranas. Li et al. (2012) verificaram que nas raízes de plantas de lentilhas a exposição durante 15 dias a 150 e 300  $\mu\text{M}$  de Zn, resultou também num aumento dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e MDA. No presente estudo, a única enzima ativa na remoção do excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é a POD que, normalmente, está ativa para baixas intensidades de stresse. O teor de ASA também aumenta significativamente sugerindo que este composto está ativo e com função antioxidante para a eliminação das ROS. Neste caso, uma concentração mais elevada permite desencadear uma resposta na planta face ao stresse induzido por Zn, mas que não é suficiente para evitar o aparecimento de peroxidação lipídica.

Tanto para a F20 (50, 150  $\mu\text{M}$ ) como na R20 (150  $\mu\text{M}$ ) observa-se uma diminuição na atividade da GR, indicando que a presença de Zn tem um efeito inibitório na atividade desta enzima. Este efeito também foi verificado por Ramakrishna e Rao (2013) num estudo realizado sobre o efeito da toxicidade de Zn no metabolismo da glutathione de plantas de rabanete contaminadas com este elemento.

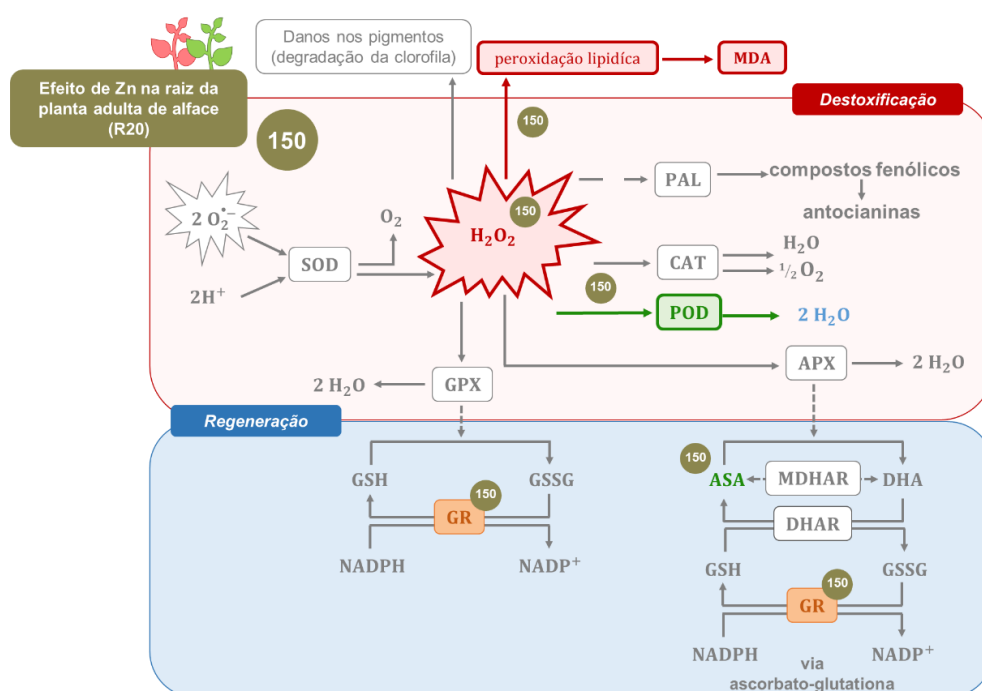
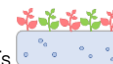
#### **5.4.5.2.4. Avaliação da resposta antioxidante da planta adulta face à toxicidade induzida por Zn**

Com os resultados obtidos para a planta adulta é possível apresentar um esquema metabólico de resposta da planta de alface face à presença de zinco. Estes esquemas são distinguidos para folhas (**Figura 5.64**) e raiz (**Figura 5.65**).



**Figura 5.64** – Representação esquemática da resposta antioxidante em F20 de alface M4E contaminada com 50 e 150 µM Zn (indicado na figura como 50 e 150).

A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais. A laranja estão representados os mecanismos enzimáticos que diminuem na defesa.



**Figura 5.65** – Representação esquemática da resposta antioxidante em R20 de alface M4E contaminada com 50 e 150 µM Zn (indicado na figura como 50 e 150).

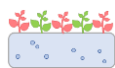
A verde estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a vermelho os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a azul os compostos formados que não são prejudiciais. A laranja estão representados os mecanismos enzimáticos que diminuem na defesa.

Em folhas expostas a 50 µM, a defesa da planta baseia-se na ativação da GPX que tem um papel crucial na manutenção dos níveis baixos de peróxido no meio, evitando o aparecimento de danos oxidativos.

A exposição a 150 µM origina a ativação da PAL, com a síntese de compostos fenólicos e de antocianinas, que também se observam visualmente como sintoma de toxicidade induzida por estas condições experimentais. Esta concentração é a única que ativa um maior número de enzimas (SOD, POD, APX, GPX) no combate ao stresse oxidativo, quando comparado com os outros EPTs em estudo. O ASA e GSH também tem um papel fundamental na resposta da planta, podendo estar ativa a via ascorbato-glutationa.

Na raiz, apenas a concentração mais elevada de Zn desencadeia uma resposta da planta com a ativação da POD e síntese de ASA, mas que também não é suficiente para evitar a peroxidação lipídica. Por este motivo, apenas se realiza um esquema metabólico para a raiz exposta a 150 µM.





Estes resultados sugerem que a exposição a uma concentração superior de zinco reflete-se num maior stresse oxidativo induzido por este elemento, ou seja, num maior número de mecanismos de defesa ativos, tanto nas folhas como nas raízes das plantas de alface.

### *Conclusões intercalares*

Em plantas jovens não se observam sintomas visíveis de toxicidade em plantas contaminadas com Zn (50, 150  $\mu$ M, 2 dias de exposição). Também não se observam diferenças significativas na massa fresca da parte aérea e raiz das plantas contaminadas, evidenciando que o crescimento das plantas não é afetado por este nível de toxicidade.

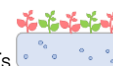
Nas plantas adultas já se observam sintomas visíveis de toxicidade. Nas plantas expostas a 50 e 150  $\mu$ M (20 dias de exposição), é notória uma diminuição no tamanho das plantas. Estes sintomas são mais intensos para a concentração mais elevada, ocorrendo o aparecimento de uma coloração avermelhada nas folhas, as folhas velhas apresentam-se murchas e com falta de vigor e as raízes ficam mais amareladas. A biomassa da parte aérea e da raiz diminui de forma significativa com o aumento da concentração de zinco em solução nutritiva, sendo a percentagem de diminuição de ambos os órgãos igual.

Na planta jovem não existem grandes variações no teor de água das plantas, ao contrário do que acontece na planta adulta onde existe uma ligeira diminuição no teor de água, que se deve, provavelmente, ao efeito tóxico deste elemento na diminuição do crescimento da raiz. Por este motivo existe interferência na absorção de água pelas plantas, que se traduz no seu posterior transporte para a parte aérea e daí o aparecimento de folhas murchas.

Na planta jovem, o Zn não compete com a absorção e acumulação de nenhum elemento químico, a sua influência é sempre no sentido de um aumento ( $\uparrow$ Na, Cu, Mn, Ca). Na planta adulta, os níveis tóxicos de zinco presentes interferem com a absorção de outros elementos ( $\uparrow$ Fe, Cu, Mn, Ca, Na;  $\downarrow$ K, Mg, Cu, Ca).

A acumulação de zinco ocorre preferencialmente na raiz, tal como acontece para os restantes EPTs. Isto ocorre porque o Zn é um elemento essencial e, por esse motivo, não existe grande restrição à sua entrada na planta. Esta é uma das razões porque este elemento é facilmente translocado para a parte aérea e se acumula em elevadas concentrações nesse órgão (superior a todos os outros EPTs em estudo).

Em relação ao Zn dado que não existe legislação em vigor para o limite máximo permitido em hortícolas de folha, são apenas interpretados os conteúdos comparativamente com aos níveis



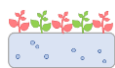
normais presentes em plantas de 15-200 mg de Zn kg<sup>-1</sup> MS (Nagajyoti et al., 2010). A concentração de Zn nas folhas de alface ao fim de 2 dias de exposição é de 197,64±2,83 mg de Zn kg<sup>-1</sup> MS (50 µM) e 261,36±17,44 mg de Zn kg<sup>-1</sup> MS (150 µM). Os níveis obtidos para a planta jovem encontram-se dentro dos níveis referidos anteriormente, apesar de na concentração mais elevada o valor já ser ligeiramente acima do limite. No entanto, ao fim de 20 dias de exposição as folhas acumularam uma quantidade bastante superior, 358,31±12,29 mg de kg<sup>-1</sup> MF (50 µM) e 956,32±72,44 mg de kg<sup>-1</sup> MF (15 µM). Estes valores estão visivelmente acima dos valores normais apresentados.

Na planta jovem, em folhas, a resposta da planta foi muito mais ativa para a concentração mais elevada de Zn aplicada. Em plantas contaminadas com 50 µM a defesa da planta baseia-se no aumento da atividade enzimática da PAL e produção de antocianinas, assim como na síntese de ASA. Um nível de concentração superior, ativa um maior número de mecanismos, nomeadamente, aumento nos teores de compostos fenólicos e PAL, mecanismos de resposta enzimáticos (POD, APX) e não-enzimáticos (ASA, GSH), podendo a via ascorbato-glutationa estar ativa. Em ambos os níveis de contaminação, a resposta da planta é eficiente no controlo dos teores de peróxido de hidrogénio evitando o aparecimento de peroxidação lipídica.

Na raiz de plantas jovens contaminadas com 50 µM, os níveis de stresse são controlados pelo aumento da atividade enzimática da CAT. No entanto, nas raízes de plantas contaminadas com 150 µM, como existe uma maior acumulação de zinco neste órgão, a resposta da planta (SOD) face ao stresse induzido por este elemento não é suficiente para evitar o aparecimento de danos nas células.

Na planta adulta, em folhas novas contaminadas com 50 µM de Zn, a GPX que tem um papel crucial na manutenção dos níveis baixos de peróxido no meio, evitando o aparecimento de danos oxidativos. Nas folhas velhas, continua a existir este controlo do stresse oxidativo, mas através do aumento da produção de compostos fenólicos e síntese de ASA.

A resposta da planta adulta ao stresse induzido pela presença de 150 µM de Zn é mais intensa que a obtida para a planta jovem. Neste caso, a resposta da planta consiste na ativação de reações do metabolismo secundário, como os mecanismos enzimáticos (SOD, POD, APX, GPX) e não-enzimáticos (ASA, GSH), com o possível envolvimento da via ascorbato-glutationa, bem como um aumento na produção de antocianinas e de compostos fenólicos. No entanto, estes mecanismos não são eficientes no controlo dos níveis de peróxido de hidrogénio e em evitar o aparecimento de peroxidação lipídica nas células. Nas folhas velhas, a resposta da planta também não é eficiente, havendo uma resposta da planta que se baseia



no aumento da produção de compostos fenólicos, aumento da atividade enzimáticas de varias enzimas antioxidantes (SOD, CAT, POD, APX), assim como no aumento da síntese de ASA.

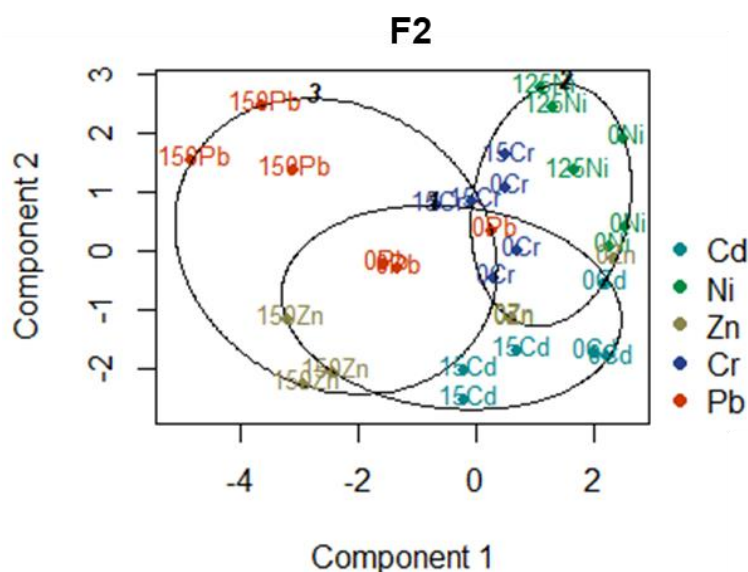
Na raiz das plantas contaminadas com 50  $\mu\text{M}$  de Zn, existe um menor grau de stresse oxidativo e não se verifica a ativação de nenhum mecanismo de resposta da planta porque provavelmente, para estas condições experimentais, a maior parte do zinco fica retido nas paredes celulares das raízes ou quelatado, sendo armazenado nos vacúolos neutralizando o seu efeito prejudicial. Uma exposição a 150  $\mu\text{M}$  de Zn, já resulta no aparecimento de peroxidação lipídica, ocorrendo um aumento na atividade da POD e ASA de modo a controlar os níveis em excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Estes resultados sugerem que as plantas jovens apresentam um nível de stresse oxidativo induzido pela presença de zinco menor, à exceção da raiz de plantas contaminadas com 150  $\mu\text{M}$  de Zn, porque possivelmente é neste órgão e nestas condições de ensaio onde ocorre a maior acumulação deste elemento e a resposta da planta não é eficiente em controlar a sua destoxificação.

Nas plantas de alface adultas, a exposição a um nível de stress menor (50  $\mu\text{M}$ ), resulta numa resposta da planta eficiente, tanto em folhas como na raiz. Com a exposição a um nível de toxicidade superior, a planta tenta contrariar o efeito das elevadas concentrações das ROS devido à presença de Zn, através de uma resposta ordenada envolvida na sua destoxificação (mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos), mas que não é eficiente em evitar o aparecimento de danos oxidativos nas plantas.

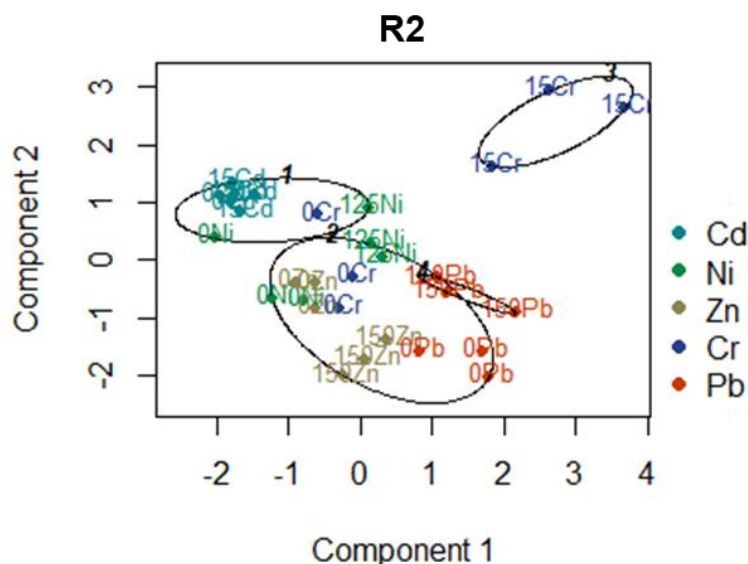
#### 5.4.6. Avaliação da toxicidade dos EPTs estudados

Para se avaliar a toxicidade dos EPTs estudados realizou-se um método de partição (PAM) que permitisse separar os indivíduos por classes. É importante referir que é com um maior tempo de exposição e a concentração mais elevada de Cd (15  $\mu\text{M}$ ), Cr (15  $\mu\text{M}$ ), Pb (150  $\mu\text{M}$ ), Ni (125  $\mu\text{M}$ ) e Zn (150  $\mu\text{M}$ ), que é desencadeada uma resposta da planta mais ativa no combate ao stresse oxidativo. Neste sentido, realizou-se uma análise classificatória com os dados obtidos para a planta jovem (**Figura 5.66 e 5.67**) e adulta (**Figura 5.68 e 5.69**) exposta a cada uma dessas concentrações em folhas e raiz.



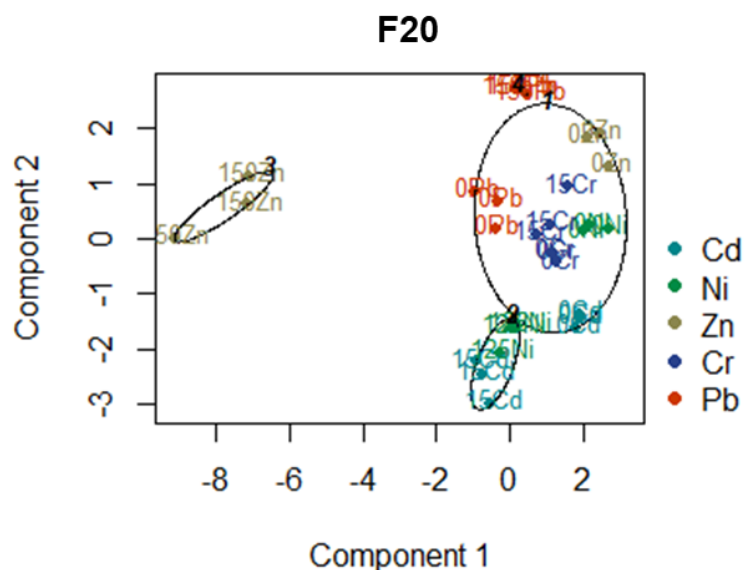
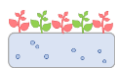
**Figura 5.66** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos, de plantas jovens de alface M4E, expostos a Cd (15  $\mu\text{M}$ ), Cr (15  $\mu\text{M}$ ), Pb (150  $\mu\text{M}$ ), Ni (125  $\mu\text{M}$ ) e Zn (150  $\mu\text{M}$ ), ao fim de 2 dias de tratamento ( $n=3$ ). A análise classificatória é efetuada com os resultados obtidos, em folhas, para os teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e MDA ( $\mu\text{M g}^{-1}$ ), teor de compostos fenólicos ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e antocianinas ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ), atividades enzimáticas da SOD, CAT, POD, APX, GPX, GR e PAL ( $\text{U g}^{-1}$ ), metabolitos antioxidantes não-enzimáticos (ASA, GSH,  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ). Estas duas componentes explicam 78,38 % da variabilidade.

Os indivíduos estão apresentados com base na concentração de cada metal aplicado e com a coloração correspondente representada na legenda.



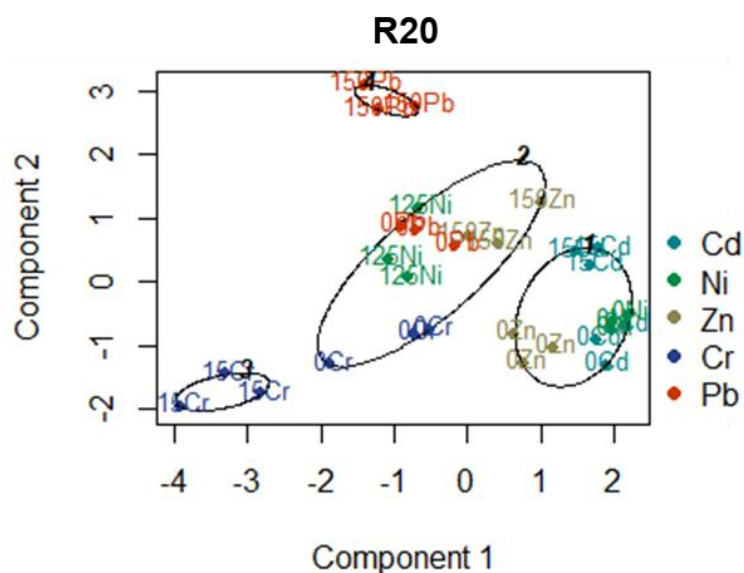
**Figura 5.67** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos, de plantas jovens de alface M4E, expostos a Cd (15  $\mu\text{M}$ ), Cr (15  $\mu\text{M}$ ), Pb (150  $\mu\text{M}$ ), Ni (125  $\mu\text{M}$ ) e Zn (150  $\mu\text{M}$ ), ao fim de 2 dias de tratamento ( $n=3$ ). A análise classificatória é efetuada com os resultados obtidos, em raiz, os teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e MDA ( $\mu\text{M g}^{-1}$ ), atividades enzimáticas da SOD, CAT, POD e GR ( $\text{U g}^{-1}$ ). Estas duas componentes explicam 73,40 % da variabilidade.

Os indivíduos estão apresentados com base na concentração de cada metal aplicado e com a coloração correspondente representada na legenda.



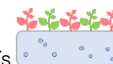
**Figura 5.68** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos, de plantas adultas de alface M4E, expostos a Cd (15  $\mu$ M), Cr (15  $\mu$ M), Pb (150  $\mu$ M), Ni (125  $\mu$ M) e Zn (150  $\mu$ M), ao fim de 20 dias de tratamento (n=3). A análise classificatória é efetuada com os resultados obtidos, em folhas novas, para os teores de  $H_2O_2$  ( $\mu$ g g<sup>-1</sup>) e MDA ( $\mu$ M g<sup>-1</sup>), teor de compostos fenólicos (mg g<sup>-1</sup>) e antocianinas ( $\mu$ mol g<sup>-1</sup>), atividades enzimáticas da SOD, CAT, POD, APX, GPX, GR e PAL (U g<sup>-1</sup>), metabolitos antioxidantes não-enzimáticos (ASA, GSH,  $\mu$ mol g<sup>-1</sup>). Estas duas componentes explicam 73,93 % da variabilidade.

Os indivíduos estão apresentados com base na concentração de cada metal aplicado e com a coloração correspondente representada na legenda.



**Figura 5.69** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos, de plantas adultas de alface M4E, expostos a Cd (15  $\mu$ M), Cr (15  $\mu$ M), Pb (150  $\mu$ M), Ni (125  $\mu$ M) e Zn (150  $\mu$ M), ao fim de 20 dias de tratamento (n=3). A análise classificatória é efetuada com os resultados obtidos, em raiz, os teores de  $H_2O_2$  ( $\mu$ g g<sup>-1</sup>) e MDA ( $\mu$ M g<sup>-1</sup>), atividades enzimáticas da SOD, CAT, POD, APX, GR (U g<sup>-1</sup>) e ASA ( $\mu$ mol g<sup>-1</sup>). Estas duas componentes explicam 73,15 % da variabilidade.

Os indivíduos estão apresentados com base na concentração de cada metal aplicado e com a coloração correspondente representada na legenda.



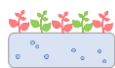
Na planta jovem, em folhas, não é possível fazer uma diferenciação dos indivíduos por classes indicando que nesta fase de desenvolvimento não se consegue diferenciar o efeito de cada elemento (**Figura 5.66**).

Na raiz, pelo contrário, já é possível identificar uma classe bem diferenciada com os indivíduos contaminados com crómio (15  $\mu\text{M}$ ), o que está de acordo com o descrito anteriormente, em que este elemento é um dos que tem maior efeito na raiz das plantas de alface. Nesta análise classificatória também é possível verificar outra classe, ainda que sobreposta, com os indivíduos contaminados com chumbo (150  $\mu\text{M}$ ), o que também está concordante com o facto de este elemento, tal como o Cr, ser um dos que mais influência tem nas raízes. Nas outras duas classes encontram-se os restantes indivíduos, não sendo possível fazer nenhuma distinção (**Figura 5.67**).

Na planta adulta, em folhas, através desta análise classificatória é possível verificar que existe: (i) uma classe muito bem individualizada com os indivíduos sujeitos a 150  $\mu\text{M}$  de Zn (**Figura 5.68-3**); (ii) outra classe também bem diferenciada com os indivíduos expostos a 150  $\mu\text{M}$  de Pb (**Figura 5.68-4**); (iii) uma classe com os indivíduos contaminados com 15  $\mu\text{M}$  de Cd e 125  $\mu\text{M}$  de Ni (**Figura 5.68-2**); e, por fim, (iv) uma classe com os restantes indivíduos (controlo e contaminados com crómio, 15  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 5.68-1**).

Estes resultados demonstram que estes indivíduos (150  $\mu\text{M}$  Zn, 150  $\mu\text{M}$  Pb, 15  $\mu\text{M}$  Cd, 125  $\mu\text{M}$  Ni) são diferentes de todos os outros e que se encontram claramente separados dos indivíduos controlo correspondentes. O mesmo comportamento já não se verifica para os indivíduos contaminados com Cr, evidenciando que este elemento é o que tem menor efeito nas folhas das plantas de alface. Isto está de acordo com os resultados obtidos na caracterização da resposta da planta, no caso do Cd, Ni, Zn, sendo para estes elementos que se observa um grau de stresse oxidativo superior. No caso do Pb, esta separação ocorre porque as concentrações utilizadas foram superiores às utilizadas para o Cr e tiveram um maior efeito na ativação de mecanismos de resposta da planta.

Em raiz, é possível verificar a separação em 4 classes bem distintas: (i) uma classe muito bem individualizada com os indivíduos sujeitos a 15  $\mu\text{M}$  de Cr (**Figura 5.68-3**); (ii) outra classe também bem diferenciada com os indivíduos expostos a 150  $\mu\text{M}$  de Pb (**Figura 5.68-4**); e (iii) duas classes com os restantes indivíduos (controlo e contaminados 15  $\mu\text{M}$  de Cd, 125  $\mu\text{M}$  de Ni, 150  $\mu\text{M}$  de Zn) (**Figura 5.69-1, 5.69-2**). Estes resultados evidenciam que o crómio e chumbo, tal como verificado para a planta jovem, são os elementos que, por se acumularem



preferencialmente neste órgão, apresentam, aparentemente, um maior efeito tem na raiz das plantas de alface e daí esta diferenciação.

## 5.5. Conclusões

Os mecanismos de resposta metabólica específicos para cada EPT que permitem suportar as elevadas concentrações de Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn, nos seus diferentes órgãos, encontram-se apresentados para as folhas novas (**Tabela 5.30**), raiz (**Tabela 5.31**) e folhas velhas (**Tabela 5.32**).

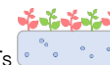
Na planta jovem, apesar da acumulação verificada para cada elemento potencialmente tóxico, a alface não evidencia sintomas visíveis de toxicidade em plantas contaminadas com Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn. Na planta jovem observa-se um menor grau de stresse oxidativo presente face a estas condições experimentais. Este comportamento, provavelmente, ocorre porque a planta esteve exposta ao stresse durante um período de tempo mais curto.

A planta jovem de alface demonstra ativar a sua defesa antioxidante consoante a intensidade de stresse presente no meio. Este comportamento é verificado através da reposta diferente que a planta tem consoante os diferentes tipos de EPTs em estudo, assim como nos níveis de concentração presentes.

Regra geral, neste estado de desenvolvimento, a planta de alface avermelhada demonstra tolerar a presença destes EPTs, não apresentando sintomas visíveis de toxicidade. Este comportamento é comprovado através do não aparecimento de danos oxidativos (peroxidação lipídica) e controlo dos níveis de  $H_2O_2$ , nas plantas expostas a Cd, Cr, Ni, Zn e Pb.

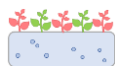
Em folhas, os mecanismos de resposta metabólica específicos da planta jovem face à presença de Cd consistem na produção de ASA (5, 15  $\mu M$ ) e no aumento da atividade da PAL e na, consequente, produção de compostos fenólicos (15  $\mu M$ ). Na presença de Cr, o metabolismo da GSH parece ser fundamental no controlo do stresse oxidativo presente, assim como o aumento da produção de compostos fenólicos (5  $\mu M$ ) e de antocianinas (15  $\mu M$ ), bem como a ativação de mecanismos antioxidantes enzimáticos (POD, GR, 15  $\mu M$ ).



**Tabela 5.30** – Resumo da resposta obtida em folhas novas expostas a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn, para as plantas jovens e adultas.

planta jovem - F2										
	Cd		Cr		Pb		Ni		Zn	
	5 µM	15 µM	5 µM	15 µM	125 µM	150 µM	50 µM	125 µM	50 µM	150 µM
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse	-	compostos fenólicos, PAL	compostos fenólicos	antocianinas	-	antocianinas, PAL	antocianinas, compostos fenólicos, PAL	antocianinas	antocianinas, PAL	compostos fenólicos, PAL
Antioxidantes enzimáticos	-	-	-	POD, GR	POD	CAT	-	-	-	POD, APX
Antioxidantes não-enzimáticos	ASA	ASA	GSH	GSH	GSH	-	-	GSH	ASA	ASA, GSH
planta adulta - F20										
	Cd		Cr		Pb		Ni		Zn	
	5 µM	15 µM	5 µM	15 µM	125 µM	150 µM	50 µM	125 µM	50 µM	150 µM
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA	-	-	-	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse	compostos fenólicos, PAL	antocianinas, compostos fenólicos	compostos fenólicos	antocianinas, compostos fenólicos	-	-	antocianinas, PAL	antocianinas, PAL	-	antocianinas, compostos fenólicos, PAL
Antioxidantes enzimáticos	CAT, APX	POD, APX	-	GR	CAT	CAT, GPX	CAT	POD	GPX	SOD, POD, APX, GPX
Antioxidantes não-enzimáticos	-	GSH	ASA	-	ASA, GSH	-	ASA, GSH	ASA, GSH	-	ASA, GSH

As variáveis apresentadas são as que apresentam um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) comparativamente ao controlo. Apenas se consideram os parâmetros de avaliação da intensidade do stresse e a defesa antioxidante.

**Tabela 5.31** – Resumo da resposta obtida na raiz exposta a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn, para as plantas jovens e adultas.

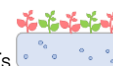
planta jovem - R2										
	Cd		Cr		Pb		Ni		Zn	
	5 µM	15 µM	5 µM	15 µM	125 µM	150 µM	50 µM	125 µM	50 µM	150 µM
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas	-	-	-	MDA	-	-	-	-	-	MDA
Antioxidantes enzimáticos	-	-	-	POD	CAT, POD	CAT	-	-	CAT	SOD
planta adulta - R20										
	Cd		Cr		Pb		Ni		Zn	
	5 µM	15 µM	5 µM	15 µM	125 µM	150 µM	50 µM	125 µM	50 µM	150 µM
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA
Antioxidantes enzimáticos	CAT	CAT	POD	CAT, POD	-	CAT	POD	CAT, POD, APX	-	POD
Antioxidantes não-enzimáticos	ASA	ASA	-	-	-	-	-	ASA	-	ASA

As variáveis apresentadas são as que apresentam um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) comparativamente ao controlo. Apenas se consideram os parâmetros de avaliação da intensidade do stresse e a defesa antioxidante.

**Tabela 5.32** – Resumo da resposta obtida nas folhas velhas expostas a diferentes concentrações de Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn, para as plantas adultas.

planta adulta - FV20										
	Cd		Cr		Pb		Ni		Zn	
	5 µM	15 µM	5 µM	15 µM	125 µM	150 µM	50 µM	125 µM	50 µM	150 µM
Parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA
Parâmetros de avaliação da intensidade do stresse	compostos fenólicos	compostos fenólicos	compostos fenólicos	-	compostos fenólicos	-	compostos fenólicos	compostos fenólicos	compostos fenólicos	compostos fenólicos
Antioxidantes enzimáticos	CAT, POD, APX	POD, APX	POD	CAT	-	-	CAT, POD	SOD, POD, GR	-	SOD, CAT, POD, APX
Antioxidantes não-enzimáticos	-	ASA	-	ASA	-	-	ASA	ASA	ASA	ASA

As variáveis apresentadas são as que apresentam um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) comparativamente ao controlo. Apenas se consideram os parâmetros de avaliação da intensidade do stresse e a defesa antioxidante.



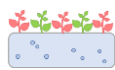
Na exposição a 150  $\mu\text{M}$  de Pb, o mecanismo de resposta consiste no aumento na atividade da PAL, na produção de antocianinas e na ativação da atividade enzimática da CAT. A resposta da planta face à presença de Ni consiste na síntese de antocianinas (50, 125  $\mu\text{M}$ ), aumento da atividade da PAL e produção de compostos fenólicos (50  $\mu\text{M}$ ), assim como no aumento da produção da GSH (125  $\mu\text{M}$ ). No caso da exposição a Zn, uma concentração menor ativa origina um aumento na atividade da PAL e síntese de antocianinas, e na exposição a 150  $\mu\text{M}$  há também um aumento na atividade da PAL e, por consequência, produção de compostos fenólicos, assim como mecanismos enzimáticos (POD, APX) e não-enzimáticos (ASA, GSH).

Na raiz da planta jovem, apenas se observam danos oxidativos nas plantas contaminadas com 15  $\mu\text{M}$  de Cr e 150  $\mu\text{M}$  de Zn, indicando que possivelmente o nível de acumulação destes elementos é muito elevado e a planta não consegue controlar o stresse oxidativo. No caso do chumbo, apesar de os níveis elevados de chumbo acumulados, a planta consegue controlar eficientemente os teores de ROS e a peroxidação lipídica através de mecanismos antioxidantes enzimáticos (CAT, POD). Nos restantes elementos, não se observa a ativação de mecanismos de defesa nem efeitos adversos, provavelmente, porque os EPTs ficam retidos nas raízes, adsorvidos às paredes celulares ou ligados a ácidos orgânicos ou quelatos, sendo posteriormente armazenados nos vacúolos e evitando-se assim o seu efeito adverso.

Na planta adulta, os resultados obtidos indicam que a capacidade de resposta da planta difere consoante a intensidade do stresse e cada EPT desencadeia a ativação de diferentes mecanismos de destoxificação na planta.

Na planta adulta, os elementos que apresentam maiores valores percentuais de translocação para a parte aérea (Cd, Ni, Zn) são os que têm maior efeito em folhas. As plantas de alface não conseguem controlar os níveis de peróxido de hidrogénio e peroxidação lipídica presentes, evidenciando que nestes casos a planta não tem uma resposta eficiente face ao stresse induzido por cada um dos EPTs, apesar da resposta concertada entre mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos. Estes níveis de intensidade de stresse, provavelmente, foram demasiado elevados para a planta suportar, existindo sintomas visíveis de toxicidade evidentes nos casos de maior toxicidade.

Os mecanismos de resposta metabólica específicos da planta adulta face à presença de Cd consistem no aumento da atividade da PAL (5  $\mu\text{M}$ ), aumento da produção de compostos fenólicos (5, 15  $\mu\text{M}$ ) e de antocianinas (15  $\mu\text{M}$ ), assim como a ativação de mecanismos



antioxidantes enzimáticos (CAT, APX, 5  $\mu$ M; POD, APX, 15  $\mu$ M) e não-enzimáticos (GSH, 15  $\mu$ M).

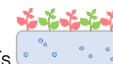
Na presença de Ni, a resposta da planta consiste na ativação de mecanismos que envolvem a PAL e produção de antocianinas (50, 125  $\mu$ M), mecanismos enzimáticos (CAT, 50  $\mu$ M; POD, 125  $\mu$ M) e não-enzimáticos (ASA, GSH, 50, 125  $\mu$ M).

No caso da exposição a Zn, uma concentração menor (50  $\mu$ M), origina um aumento na atividade da GPX, que é a única enzima responsável por tentar manter os níveis de  $H_2O_2$ , enquanto um nível de concentração superior (150  $\mu$ M) origina a ativação de outros mecanismos envolvendo a PAL, síntese de antocianinas e compostos fenólicos, assim como mecanismos enzimáticos (SOD, POD, APX, GPX) e metabolitos antioxidantes não-enzimáticos (ASA, GSH).

No caso da contaminação com Cr e Pb, possivelmente, por estes elementos serem muito pouco translocados para a parte aérea, a resposta da planta adulta é eficiente e não existem danos oxidativos. Nas plantas adultas contaminadas com crômio, os mecanismos de resposta consistem no aumento da produção de compostos fenólicos (5, 15  $\mu$ M) e de antocianinas (15  $\mu$ M), assim como na ativação de metabolitos antioxidantes não-enzimáticos como o ASA (5  $\mu$ M), e aumento da atividade enzimática da GR (15  $\mu$ M). A resposta da planta adulta face à presença de chumbo, consiste basicamente no aumento de enzimas antioxidantes, como a CAT (125, 150  $\mu$ M) e GPX (150  $\mu$ M), assim como na produção de ASA e GSH (125  $\mu$ M).

As folhas demonstram ser mais sensíveis à presença de EPTs quando comparado com a raiz, apesar de ser na raiz que se verifica uma maior acumulação de cada elemento. Diferentes fatores contribuem para este comportamento, nomeadamente, (i) um maior teor de ROS nas folhas, (ii) uma menor toxicidade provocada pelos EPTs retidos na raiz, relativamente à parte aérea (5, 15  $\mu$ M Cr; 125, 150  $\mu$ M Pb) e (iii) provavelmente, uma incapacidade na defesa da planta em remover os ROS que originam danos oxidativos na parte aérea comparativamente às raízes, tal como acontece para o Cd (5 e 15  $\mu$ M), Ni (50 e 125  $\mu$ M) e Zn (150  $\mu$ M).

As folhas velhas evidenciam um grau de intensidade de stresse superior para a maior parte dos metais estudados. Nas folhas velhas, as plantas mais afetadas são as que foram contaminadas com Cd (5, 15  $\mu$ M), Ni (125  $\mu$ M) e Zn (150  $\mu$ M) pois são os elementos que apresentam valores percentuais de translocação superiores. Para todos os EPTs existe um aumento na produção de compostos fenólicos como mecanismo de defesa da planta, assim como o aumento da produção de ASA (exceto para o chumbo). É importante referir que a presença de diferentes concentrações de cada EPTs permite ativar diferentes mecanismos



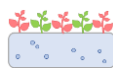
de resposta, à exceção da contaminação com chumbo que parece ter pouca interferência em desencadear stresse oxidativo nas folhas velhas.

Na raiz da planta adulta, a exposição a 125  $\mu\text{M}$  de Pb, 125  $\mu\text{M}$  de Ni, 150  $\mu\text{M}$  de Zn, origina o aparecimento de danos oxidativos neste órgão, pelo que nestes casos a planta não consegue controlar o stresse oxidativo, sendo isso também evidente no aparecimento de sintomas visíveis neste órgão (amarelecimento, necroses, diminuição de tamanho). Isto ocorre devido aos níveis elevados presentes de elementos essenciais (Ni, Zn) e não existindo grande restrição à sua entrada. No caso do chumbo, para além dos níveis elevados presentes em solução nutritiva, este elemento acumula-se preferencialmente neste órgão, sendo muito pouco translocado para a parte aérea. Nos restantes elementos, os níveis de stresse oxidativo são eficientemente controlados, principalmente, através da CAT, POD e síntese de ASA, e provavelmente, parte dos EPTs ficam retidos nas raízes, adsorvidos às paredes celulares ou ligados a moléculas orgânicas ou quelatos, sendo, posteriormente, armazenados nos vacúolos e evitando-se assim o seu efeito prejudicial.

Resumindo, a presença destes EPTs pode induzir stresse oxidativo indiretamente através da diminuição da eficiência do sistema antioxidante, inibindo a atividade destas enzimas, ou promovendo a sua síntese. Através da compreensão dos mecanismos de resposta, pode-se salientar que reações como a produção de compostos fenólicos e antocianinas, são fundamentais na capacidade de tolerância da planta de alface avermelhada face à presença de elevadas concentrações de EPTs.

Com os resultados obtidos é possível verificar que a resposta da planta de alface depende de diferentes fatores como o estado de desenvolvimento da planta, os diferentes órgãos da planta (raiz ou parte aérea), o tipo de EPT, a influência de cada EPT nos elementos químicos absorvidos, a quantidade de EPT acumulada, o tempo de exposição ao stresse e a intensidade do tratamento aplicado. Através destes fatores é possível compreender que a planta de alface M4E apresenta uma resposta condicionada pelas condições de stresse a que é sujeita. Por exemplo, a resposta difere conforme a presença de Cd ou Cr, apesar das mesmas concentrações aplicadas.

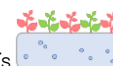
Este estudo foi realizado em solução nutritiva, no entanto deve-se ter em conta que no solo, a interação entre o solo-planta potencia um conjunto de fatores que podem alterar a acumulação e tolerância da planta de alface, bem como possivelmente os mecanismos de resposta envolvidos. Deste modo, foram desenvolvidos ensaios em solos que vão ser descrito no **Capítulo VI**.



## 5.6. Referências Bibliográficas

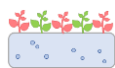
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* **196**, 67-76.
- Ahmad, M., Wahid, A., Ahmad, S. S., Butt, Z. A., Tariq, M. (2011). Ecophysiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) to hexavalent chromium. *Pak. J. Bot.* **43**, 2853–2859.
- Ahmad, P., Sarwat, M., Sharma, S. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology* **51**, 167-173.
- Ahmad, R., Kim, Y.-H., Kim, M.-D., Kwon, S.-Y., Cho, K., Lee, H.-S., Kwak, S.-S. (2010). Simultaneous expression of choline oxidase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in potato plant chloroplasts provides synergistically enhanced protection against various abiotic stresses. *Physiologia Plantarum* **138**, 520-533.
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1331-1341.
- Amjad, M., Akhtar, J., Murtaza, B., Abbas, G., Jawad, H. (2016). Differential accumulation of potassium results in varied salt-tolerance response in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **57**, 248-258.
- Anderson, J. A. (2002). Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves. *Scientia Horticulturae* **95**, 277-284.
- Andresen, E., Kappel, S., Stärk, H. J., Riegger, U., Borovec, J., Mattusch, J., Heinz, A., Schmelzer, C. E. H., Matoušková, Š., Dickinson, B., Küpper, H. (2016). Cadmium toxicity investigated at the physiological and biophysical levels under environmentally relevant conditions using the aquatic model plant *Ceratophyllum demersum*. *New Phytologist* **210**, 1244-1258.
- Anjum, N. A., Ahmad, I., Mohmood, I., Pacheco, M., Duarte, A. C., Pereira, E., Umar, S., Ahmad, A., Khan, N. A., Iqbal, M., Prasad, M. N. V. (2012). Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—A review. *Environmental and Experimental Botany* **75**, 307-324.
- Aono, M., Kubo, A., Saji, H., Tanaka, K., Kondo, N. (1993). Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with high chloroplastic glutathione reductase activity. *Plant and Cell Physiology* **34**, 129–135.
- Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373-399.
- Araceli, C. O., Ma de Lourdes, P. H., Ma Elena, P. H., Rodríguez, J. A., Andrés, G. V. (2009). Chemical studies of anthocyanins. *Rev Food Chem* **13**, 859–871.
- Aravind, P., Prasad, M. N. V. (2005). Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate–glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 107-116.
- Armas, T., Pinto, A. P., de Varennes, A., Mourato, M. P., Martins, L. L., Gonçalves, M. L. S., Mota, A. M. (2015). Comparison of cadmium-induced oxidative stress in *Brassica juncea* in soil and hydroponic cultures. *Plant and Soil* **388**, 294-305.
- Arora, A., Byrem, T. M., Nair, M. G., Strasburg, G. M. (2000). Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373**, 102–109.
- Asada, K. (1992). Ascorbate Peroxidase - a Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzyme in Plants. *Physiologia Plantarum* **85**, 235-241.



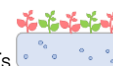


- Asada, K., Takahashi, M. (1987). Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In "Photoinhibition: Topics of Photosynthesis" (Elsevier, ed.), pp. 227-287. The Netherlands, Amsterdam.
- Baccouch, S., Chaoui, A., Ferjani, E. E. (2001). Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots. *Journal of Plant Nutrition* **24**, 1085-1097.
- Bah, A. M., Dai, H., Zhao, J., Sun, H., Cao, F., Zhang, G., Wu, F. (2011). Effects of Cadmium, Chromium and Lead on Growth, Metal Uptake and Antioxidative Capacity in *Typha angustifolia*. *Biological Trace Element Research* **142**, 77-92.
- Barnes, J. D., Zheng, Y. M., Lyons, T. M. (2002). "Plant resistance to ozone: the role of ascorbate," Omasa, K., Saji, H., Youssefian, S., Kondo, N., Tokyo, Japan.
- Barrameda-Medina, Y., Montesinos-Pereira, D., Romero, L., Ruiz, J. M., Blasco, B. (2014). Comparative study of the toxic effect of Zn in *Lactuca sativa* and *Brassica oleracea* plants: I. Growth, distribution, and accumulation of Zn, and metabolism of carboxylates. *Environmental and Experimental Botany* **107**, 98-104.
- Becker, C., Klaering, H., Kroh, L., Krumbein, A. (2014). Cool-cultivated red leaf lettuce accumulates cyanidin-3-O-(6"-O-malonyl)-glucoside and caffeoylmalic acid. *Food Chemistry* **146** 404–411.
- Bela, K., Horváth, E., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I., Csiszár, J. (2015). Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology* **176**, 192-201.
- Ben Ghnaya, A., Charles, G., Hourmant, A., Ben Hamida, J., Branchard, M. (2009). Physiological behaviour of four rapeseed cultivar (*Brassica napus* L.) submitted to metal stress. *Comptes Rendus Biologies* **332**, 363-370.
- Benavides, M. P., Gallego, S. M., Tomaro, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of plant Physiology* **17**, 21-34.
- Bernardini, A., Salvatori, E., Guerrini, V., Fusaro, L., Canepari, S., Manes, F. (2016). Effects of high Zn and Pb concentrations on *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex. Steudel: Photosynthetic performance and metal accumulation capacity under controlled conditions. *International Journal of Phytoremediation* **18**, 16-24.
- Bielen, A., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2013). The Influence of Metal Stress on the Availability and Redox State of Ascorbate, and Possible Interference with Its Cellular Functions. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 6382-6413.
- Bienert, G. P., Møller, A. L. B., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., Jahn, T. P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 1183–1192.
- Blasco, B., Graham, N. S., Broadley, M. R. (2015). Antioxidant response and carboxylate metabolism in *Brassica rapa* exposed to different external Zn, Ca, and Mg supply. *Journal of Plant Physiology* **176**, 16-24.
- Boisvert, S., Joly, D., Leclerc, S., Govindachary, S., Harnois, J., Carpentier, R. (2007). Inhibition of the oxygen-evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel. *BioMetals* **20**, 879–889.
- Bonet, A., Poschenrieder, C., Barcelo, J. (1991). Chromium III-iron interaction in Fe-deficient and Fe-sufficient bean plants. I. Growth and nutrient content. *Journal of Plant Nutrition* **14**, 403-414.

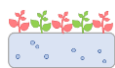




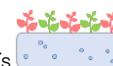
- Boo, H.-O., Heo, B.-G., Gorinstein, S., Chon, S.-U. (2011). Positive effects of temperature and growth conditions on enzymatic and antioxidant status in lettuce plants. *Plant Science* **181**, 479-484.
- Boominathan, R., Doran, P. M. (2002). Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New Phytologist* **156**, 205-215.
- Boonyapookana, B., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Singhakaew, S. (2002). Phytoaccumulation and phytotoxicity of cadmium and chromium in duckweed *Wolffia globosa*. *Int. J. Phytoremed* **4**, 87–100.
- Borsani, O., Diaz, P., Agius, M. F., Valpuesta, V., Monza, J. (2001). Water stress generates an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. *Plant Science* **161**, 757-763.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inzé, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**, 83–116.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist* **173**, 677-702.
- Cakmak, I. (2000). Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytologist* **146**, 185-205.
- Cannata, M. G., Bertoli, A. C., Carvalho, R., Augusto, A. S., Bastos, A. R. R., Freitas, M. P., Carvalho, J. G. (2014). Stress Induced by Heavy Metals Cd and Pb in Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Grown in Nutrient Solution. *Journal of Plant Nutrition* **38**, 497-508.
- Carvalho, L. C., Coito, J. L., Goncalves, E. F., Chaves, M. M., Amancio, S. (2016). Differential physiological response of the grapevine varieties Touriga Nacional and Trincadeira to combined heat, drought and light stresses. **18 Suppl 1**, 101-11.
- Castaigns, L., Caquot, A., Loubet, S., Curie, C. (2016). The high-affinity metal Transporters NRAMP1 and IRT1 Team up to Take up Iron under Sufficient Metal Provision. *Scientific Reports* **6**, 37222.
- Cenkci, S., Cigerci, I. H., Yildiz, M., Özay, C., Bozdog, A., Terzi, H. (2010). Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. . *Environ Exp Bot* **67**, 467–473.
- Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J. C., Moreno-Sanchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *Fems Microbiology Reviews* **25**, 335-347.
- Chaffai, R., Elhamadi, M. A., Seybou, T. N., Tekitek, A., Marzouk, B., El Ferjani, E. (2007). Altered Fatty Acid Profile of Polar Lipids in Maize Seedlings in Response to Excess Copper. *Journal of Agronomy & Crop Science* **193**, 207-217.
- Chatterjee, J., Chatterjee, C. (2000). Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution* **109**, 69-74.
- Chen, C., Huang, D., Liu, J. (2009). Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects. *Clean* **37** 304–313.
- Chen, Q., Zhang, M., Shen, S. (2010). "Effect of salt on malondialdehyde and antioxidant enzymes in seedling roots of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)". *Physiologiae Plantarum* **33**, 273–278.
- Cho, U. H., Seo, N. H. (2005). Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* **168**, 113-120.
- Chon, S. U., Boo, H. O., Heo, B. G., Gorinstein, S. (2012). Anthocyanin content and the activities of polyphenol oxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in lettuce cultivars. *Int J Food Sci Nutr* **63**, 45-8.



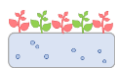
- Choppala, G., Saifullah, Bolan, N., Bibi, S., Iqbal, M., Rengel, Z., Kunhikrishnan, A., Ashwath, N., Ok, Y. S. (2014). Cellular Mechanisms in Higher Plants Governing Tolerance to Cadmium Toxicity. *Critical Reviews in Plant Sciences* **33**, 374-391.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**, 1707-1719.
- Clemens, S., Palmgren, M. G., Krämer, U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* **7**, 309-315.
- Comission Regulation (EU) 488/2014 (2014). Amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs (O. J. L. 138/75, ed.).
- Commission Regulation (EU) 1005/2015 (2015). Amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of lead in certain foodstuffs. (O. J. L. 161/9, ed.).
- Cooper-Driver, G. (2001). Contributions of Jeffrey Harbone and co-workers to study of anthocyanins. *Pytochemistry* **56**, 229-236.
- Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A., Munters, E., Artois, T., Nawrot, T., Vangronsveld, J., Smeets, K. (2010). Cadmium stress: an oxidative challenge. *BioMetals* **23**, 927-940.
- Cuypers, A., Smeets, K., Ruytinx, J., Opdenakker, K., Keunen, E., Remans, T., Horemans, N., Vanhoudt, N., Sanden, S. V., Belleghem, F. V., Guisez, Y., Colpaert, J., Vangronsveld, J. (2011). The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in Arabidopsis thaliana seedlings. *Journal of Plant Physiology* **168**, 309-316.
- Cuypers, A., Vangronsveld, J., Clijsters, H. (2001). The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of Phaseolus vulgaris. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 657-664.
- Dai, L.-P., Dong, X.-J., Ma, H.-H. (2012a). Molecular mechanism for cadmium-induced anthocyanin accumulation in Azolla imbricata. *Chemosphere* **87**, 319-325.
- Dai, L., Dong, X., Ma, H. (2012b). Molecular mechanism for cadmium-induced anthocyanin accumulation in Azolla imbricata. *Chemosphere* **87** 319–325.
- Dai, I., Xiong, Z., Huang, Y., Li, M. (2006). Cadmium-Induced Changes in Pigments, Total Phenolics, and Phenylalanine Ammonia-lyase Activity in Fronds of Azolla imbricata. *Environmental Toxicology*, 505-512.
- DalCorso, G., Farinati, S., Furini, A. (2010). Regulatory networks of cadmium stress in plants. *Plant Signal Behav* **5**, 663-7.
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., Furini, A. (2008). How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 1268-1280.
- DalCorso, G., Manara, A., Piasentin, S., Furini, A. (2014). Nutrient metal elements in plants. *Metallomics* **6**, 1770-1788.
- Dalvi, A. A., Bhalerao, S. A. (2013). Response of plants towards heavy metal toxicity: an overview of avoidance, tolerance and uptake mechanism. *Annals of Plant Sciences* **2**, 362–368.
- Davies, F. T., Puryear, J. D., Newton, R. J., Egilla, J. N., Saraiva Grossi, J. A. (2002). MYCORRHIZAL FUNGI INCREASE CHROMIUM UPTAKE BY SUNFLOWER PLANTS: INFLUENCE ON TISSUE MINERAL CONCENTRATION, GROWTH, AND GAS EXCHANGE. *Journal of Plant Nutrition* **25**, 2389-2407.



- Dazy, M., Béraud, E., Cotelle, S., Meux, E., Masfaraud, J.-F., Férard, J.-F. (2008). Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* **73**, 281-290.
- de la Rosa, G., Martinez-Martinez, A., Pelayo, H., Peralta-Videa, J. R., Sanchez-Salcido, B., Gardea-Torresdey, J. L. (2005). Production of low-molecular weight thiols as a response to cadmium uptake by tumbleweed (*Salsola kah*). *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 491-498.
- de la Rosa, G., Peralta-Videa, J. R., Montes, M., Parsons, J. G., Cano-Aguilera, I., Gardea-Torresdey, J. L. (2004). Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere* **55**, 1159-1168.
- De Pinto, M. C., De Gara, L. (2004). Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2559–2569.
- del Rio, L. A., Pastori, G. M., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Sevilla, F., Corpas, F. J., Jimenez, A., Lopez-Huertas, E., Hernandez, J. A. (1998). The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* **116**, 1195-1200.
- Dey, S. K., Jena, P. P., Kundu, S. (2009). Antioxidative efficiency of *Triticum aestivum* L. exposed to chromium stress. *Journal of Environmental Biology* **30**, 539–544.
- Dhir, B., Sharmila, P., Saradhi, P. P., Nasim, S. A. (2009). Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium rich wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**, 1790-1797.
- Di Baccio, D., Kopriva, S., Sebastiani, L., Rennenberg, H. (2005). Does glutathione metabolism have a role in the defence of poplar against zinc excess? *New Phytologist* **167**, 73-80.
- di Toppi, L. S. D., Fossati, F., Musetti, R., Mikerezi, I., Favali, M. A. (2002). Effects of hexavalent chromium on maize, tomato, and cauliflower plants. *Journal of Plant Nutrition* **25**, 701–717.
- Ding, H., Wang, G., Lou, L., Lv, J. (2016). Physiological responses and tolerance of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) exposed to chromium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **133**, 509-518.
- Diwan, H., Ahmad, A., Iqbal, M. (2010). Chromium-Induced Modulation in the Antioxidant Defense System During Phenological Growth Stages of Indian Mustard. *International Journal of Phytoremediation* **12**, 142-158.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R. (2001). Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* **52**, 1101-1109.
- Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085–1097.
- Domańska, J., Badora, A., Filipek, T. (2015). The sensitivity of *Brassica napus* ssp. *Oleifera* to cadmium (Cd) and lead (Pb) contamination at different pH of mineral and organic soils. *Journal of Elementology* **20**, 59-71.
- Drazkiewicz, M., Skorzynska-Polit, E., Krupa, Z. (2003). Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Science* **164**, 195-202.

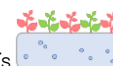


- Dresler, S., Hanaka, A., Bednarek, W., Maksymiec, W. (2014). Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of Zea mays plants treated with cadmium and copper. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**, 1565-1575.
- Dube, B. K., Tewari, K., Chatterjee, J., Chatterjee, C. (2003). Excess chromium alters uptake and translocation of certain nutrients in citrullus. *Chemosphere* **53**, 1147-1153.
- Edreva, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **106**, 119-133.
- Edwards, E. A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P. M. (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**, 278–284.
- Ekmekci, Y., Tanyolac, D., Ayhan, B. (2008). Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *Journal of Plant Physiology* **165**, 600-611.
- Elstner, E. F. (1982). Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annual Review of Plant Biology* **33**, 73–96.
- Eltayeb, A. E., Yamamoto, S., Habora, M. E. E., Tanaka, K. (2010). Greater protection against oxidative damages imposed by various environmental stresses in transgenic potato with higher level of reduced glutathione. *Breeding Science* **60**, 101–109.
- Fabiano, C. C., Tezotto, T., Favarin, J. L., Polacco, J., CandMazzafera, P. (2015). Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses. *Front. Plant Sci.* **6**, 1-4.
- Fidalgo, F., Freitas, R., Ferreira, R., Pessoa, A., Teixeira, J. (2011). Solanum nigrum L. antioxidant defense system isozymes are regulated transcriptionally and post-translationally in Cd induced stress. *Environ Exp Bot* **72**, 312–319.
- Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., Scott, I. M. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* **100**, 241–254.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* **119**, 355-364.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**, 1866-75.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal* **11**, 861-905.
- Freeman, J. L., Persans, M. W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I. J., Salt, D. E. (2004). Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* **16**, 2176-2191.
- Gajewska, E., Bernat, P., Długoński, J., Skłodowska, M. (2012). Effect of Nickel on Membrane Integrity, Lipid Peroxidation and Fatty Acid Composition in Wheat Seedlings. *Journal of Agronomy and Crop Science* **198**, 286-294.
- Gajewska, E., Skłodowska, M. (2005). Antioxidative responses and proline level in leaves and roots of pea plants subjected to nickel stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **27**, 329-339.
- Gajewska, E., Skłodowska, M. (2007). Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *BioMetals* **20**, 27–36.

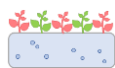


- Gajewska, E., Sklodowska, M., Slaba, M., Mazur, J. (2006). Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum* **50**, 653-659.
- Gallego, S. M., Pena, L. B., Barcia, R. A., Azpilicueta, C. E., Lannone, M. F., Rosales, E. P., Zawoznik, M. S., Groppa, M. D., Benavides, M. P. (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* **83**, 33-46.
- Gangwar, S., Singh, V. P. (2011). Indole acetic acid differently changes growth and nitrogen metabolism in *Pisum sativum* L. seedlings under chromium (VI) phytotoxicity: implication of oxidative stress. *Scientia Horticulturae* **129**, 321–328.
- Gao, Q., Zhang, L. (2008). Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate deficient *vtc1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **165**, 138–148.
- Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., Laloi, C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* **28**, 1091-1101.
- Ghisla, S., Massey, V. (1989). Mechanisms of flavoproteincatalyzed reactions. *European Journal of Biochemistry* **181**, 1–17.
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Syros, T., Yupsanis, T. (2010). Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. *Environmental and Experimental Botany* **67**, 487–494.
- Gill, R. A., Zang, L., Ali, B., Farooq, M. A., Cui, P., Yang, S., Ali, S., Zhou, W. (2015a). Chromium-induced physio-chemical and ultrastructural changes in four cultivars of *Brassica napus* L. *Chemosphere* **120**, 154-64.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Mishra, P., Sabat, S. C., Tuteja, N. (2015b). Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 10375-10394.
- Gill, S. S., Khan, N. A., Tuteja, N. (2012). Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.),. *Plant Sci.* **182** 112-120.
- Gopal, R., Rizvi, A. H. (2008). Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish. *Chemosphere* **70**, 1539-1544.
- Gopal, R., Rizvi, A. H., Nautiyal, N. (2009). Chromium alters iron nutrition and water relations of spinach. *J. Plant Nutr.* **32**, 1551–1559.
- Gratão, P. L., Monteiro, C. C., Tezotto, T., Carvalho, R. F., Alves, L. R., Peters, L. P., Azevedo, R. A. (2015). Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. **28**, 803–816.
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2005). Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* **32**, 481-494.
- Groß, F., Durner, J., Gaupels, F. (2013). Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science* **4**, 1-15.
- Guan, Z., Chai, T., Zhang, Y., Xu, J., Wei, W. (2009). Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA. *Chemosphere* **76**, 623–630.



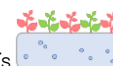


- Gülçina, I., Berashvilib, D., Gepdiremenc, A. (2005). Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankenensis* decne. *Journal of Ethnopharmacology* **101**, 287–293.
- Gupta, D., Huang, H., Yang, X., Razafindrabe, B., Inouhe, M. (2010). The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatin but the glutathione. *Journal of Hazardous Materials* **177**, 437–444.
- Gupta, D. K., Huang, H. G., Corpas, F. J. (2013). Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res Int* **20**, 2150-61.
- Gupta, D. K., Nicoloso, F. T., Schetinger, M. R., Rossato, L. V., Pereira, L. B., Castro, G. Y., Srivastava, S., Tripathi, R. D. (2009). Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. *Journal of Hazardous Materials* **172**, 479–484.
- Gusman, G. S., Oliveira, J. A., Farnese, F. S., Cambraia, J. (2013). Mineral nutrition and enzymatic adaptation induced by arsenate and arsenite exposure in lettuce plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **71**, 307-314.
- Halliwell, B. (1977). Generation of hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals during the oxidation of dihydroxyfumaric acid by peroxidase *Biochemical Journal* **163**, 441–448.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* **141**, 312-322.
- Hao, F., Wang, X., Chen, J. (2006 ). Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. *Plant Science* **170**, 151–158.
- Hatz, S., Lambert, J. D. C., Ogilby, P. R. (2007). Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochemical and Photobiological Sciences* **6**, 1106–1116.
- Hayat, S., Khalique, G., Irfan, M., Wani, A. S., Tripathi, B. N., Ahmad, A. (2012). Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. *Protoplasma* **249**, 599-611.
- Hernandez, I., Alegre, L., Breusegem, F. V., Munne-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends Plant Sci* **14**, 125–132.
- Hernández, J. A., Ferrer, M. A., Jiménez, A., Barceló, A. R., Sevilla, F. (2001). Antioxidant systems and O<sup>•</sup>-2 /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology* **127**, 817–831.
- Hernández, L. E., Sobrino-Plata, J., Montero-Palmero, M. B., Carrasco-Gil, S., Flores-Cáceres, M. L., Ortega-Villasante, C., Escobar, C. (2015). Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloid stress. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2901-2911.
- Huang, G., Guo, G., Yao, S., Zhang, N., Hu, H. (2016a). Organic acids, amino acids compositions in the root exudates and Cu-accumulation in castor (*Ricinus communis* L.) Under Cu stress. *International Journal of Phytoremediation* **18**, 33-40.
- Huang, H., Gupta, D. K., Tian, S., Yang, X., Li, T. (2012). Lead tolerance and physiological adaptation mechanism in roots of accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*. *Environmental Science and Pollution Research* **19**, 1640-1651.

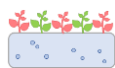


- Huang, W.-K., Ji, H.-L., Gheysen, G., Kyndt, T. (2016b). Thiamine-induced priming against root-knot nematode infection in rice involves lignification and hydrogen peroxide generation. *Molecular Plant Pathology* **17**, 614-624.
- Iqbal, N., Masood, A., Nazar, R., Syeed, S., Khan, N. (2010). Photosynthesis, growth and antioxidant metabolism in mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in Cd tolerance. *Agri Sci China* **9**, 519–527.
- Irfan, M., Hayat, S., Ahmad, A., Alyemeni, M. N. (2013). Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Saudi Journal of Biological Sciences* **20**, 1-10.
- Islam, E., Yang, X., Li, T., Liu, D., Jin, X., Meng, F. (2007). Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials* **147**, 806–816.
- Jaakola, L., Määtä-Riihinen, K., Kärenlampi, S., Hohtola, A. (2004). Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta* **218**, 721-728.
- Jackson, C., Dench, J., Moore, A. L., Halliwell, B., Foyer, C. H., Hall, D. O. (1978). Subcellular localisation and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. *European Journal of Biochemistry* **91**, 339–344.
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., delRio, L. A., Sevilla, F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* **114**, 275-284.
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., Pastori, G., del Rio, L. A., Sevilla, F. (1998). Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology* **118**, 1327-1335.
- Jonsson, M., Lind, J., Reitberger, T., Eriksen, T. E., Merenyi, G. (1993). Free radical combination reactions involving phenoxyl radicals. *J. Phys. Chem.* **97**, 8229–8233.
- Jozefczak, M., Bohler, S., Schat, H., Horemans, N., Guisez, Y., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2015). Both the concentration and redox state of glutathione and ascorbate influence the sensitivity of arabidopsis to cadmium. *Ann Bot* **116**, 601-12.
- Jozefczak, M., Keunen, E., Schat, H., Bliet, M., Hernandez, L. E., Carleer, R., Remans, T., Bohler, S., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2014). Differential response of Arabidopsis leaves and roots to cadmium: glutathione-related chelating capacity vs antioxidant capacity. *Plant Physiol Biochem* **83**, 1-9.
- Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2012). Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 3145-3175.
- Jurczuk, M., Brzoska, M. M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Gałżyn-Sidorczuk, M., Kulikowska-Karpińska, E. (2004). Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem. Toxicol.* **42** 429–438.
- Kahkonen, M. P., Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 628-633.
- Kashem, M. A., Kawai, S. (2007). Alleviation of cadmium phytotoxicity by magnesium in Japanese mustard spinach. *Soil Science and Plant Nutrition* **53**, 246-251.
- Kaur, G., Singh, H. P., Batish, D. R., Kohli, R. K. (2013). Lead (Pb)-induced biochemical and ultrastructural changes in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Protoplasma* **250**, 53–62.

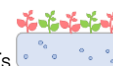




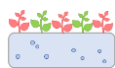
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicol.* **149**, 43–50.
- Keunen, E., Remans, T., Bohler, S., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2011). Metal-Induced Oxidative Stress and Plant Mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences* **12**, 6894-6918.
- Keunen, E., Remans, T., Opdenakker, K., Jozefczak, M., Gielen, H., Guisez, Y., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2013). A mutant of the *Arabidopsis thaliana* LIPOXYGENASE1 gene shows altered signalling and oxidative stress related responses after cadmium exposure. *Plant Physiol. Biochem.* **63**, 272–280.
- Khan, M. I. R., Nazir, F., Asgher, M., Per, T. S., Khan, N. A. (2015). Selenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium-induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat. *Journal of Plant Physiology* **173**, 9-18.
- Khan, M. R., Khan, M. M. (2010). Effect of varying concentration of Nickel and Cobalt on the plant growth and yield of Chickpea. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **4**, 1036–1046.
- Khan, N. A., Samiullah, Singh, S., Nazar, R. (2007). Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. *J. Agron. Crop Sci.* **193** 435-444.
- Kissoudis, C., Sunarti, S., van de Wiel, C., Visser, R. G. F., van der Linden, C. G., Bai, Y. (2016). Responses to combined abiotic and biotic stress in tomato are governed by stress intensity and resistance mechanism. *Journal of Experimental Botany* **67**, 5119-5132.
- Kitamura, Y., Ohta, M., Ikenaga, T., Watanabe, M. (2002). Responses of anthocyanin producing and non-producing cells of *Glehnia littoralis* to radical generators. *Phytochemistry* **59**, 63–68.
- Kopittke, P., Asher, C., Blamey, F., Menzies, N. (2007a). Toxic effects of Pb<sup>2+</sup> on the growth and mineral nutrition of signal grass (*Brachiaria decumbens*) and Rhodes grass (*Chloris gayana*). *Plant and Soil* **300**, 127-136.
- Kopittke, P. M., Asher, C. J., Kopittke, R. A., Menzies, N. W. (2007b). Toxic effects of Pb<sup>2+</sup> on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environ Pollut* **150**, 280-7.
- Kotas, J., Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution* **107**, 263-283.
- Kováčik, J., Backor, M. (2008). Oxidative status of *Matricaria chamomilla* plants related to cadmium and copper uptake. *Ecotoxicology* **17**, 471-479.
- Kovacik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Zon, J. (2011). Significance of phenols in cadmium and nickel uptake. *Journal of Plant Physiology* **168**, 576-584.
- Kumar, A., Prasad, V., Sytar, O. (2012a). Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically. *Chemosphere* **89** 1056–1065.
- Kumar, H., Sharma, D., Kumar, V. (2012b). Nickel-induced oxidative stress and role of antioxidant defence in Barley roots and leaves. *International Journal of Environmental Biology* **2**, 121-128.
- Kumar, P., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Colla, G. (2015). Effect of nickel and grafting combination on yield, fruit quality, antioxidative enzyme activities, lipid peroxidation,



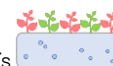
- and mineral composition of tomato. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **178**, 848-860.
- Kwon, S. Y., Jeong, Y. J., Lee, H. S., Kim, H. K., Cho, K. Y., Allen, R. D., Kwak, S. S. (2002). Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant, Cell and Environment* **25**, 873–882.
- Le Martret, B., Poage, M., Shiel, K., Nugent, G. D., Dix, P. J. (2011). Tobacco chloroplast transformants expressing genes encoding dehydroascorbate reductase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase, exhibit altered anti-oxidant metabolism and improved abiotic stress tolerance. *Plant Biotechnology Journal* **9**, 661-673.
- Lee, J., Barnes, K. W., Eisele, T., Giusti, M. M., Haché, J., Hofsommer, H., Koswig, S., Krueger, D. A., Kupina, S., Martin, S. K., Martinsen, B. K., Miller, T. C., Paquette, F., Ryabkova, A., Skrede, G., Trenn, U., Wightman, J. D. (2005a). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC international* **88**, 1269-1278.
- Lee, S. H., Ahn, S. J., Im, Y. J., Cho, K., Chung, G. C., Cho, B. H., Han, O. (2005b). Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in figleaf gourd and cucumber roots. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **330**, 1194-1198.
- Lee, Y. P., Kim, S. H., Bang, J. W., Lee, H. S., Kwak, S. S., Kwon, S. Y. (2007). Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports* **26**, 591–598.
- Leonard, S. S., Harris, G. K., Shi, X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Rad. Biol. Med.* **37**, 1921–1942.
- Li, S., Zhou, X., Li, H., Liu, Y., Zhu, L., Guo, J., Liu, X., Fan, Y., Chen, J., Chen, R. (2015). Overexpression of ZmIRT1 and ZmZIP3 Enhances Iron and Zinc Accumulation in Transgenic Arabidopsis. *PLOS ONE* **10**, e0136647.
- Li, X., Yang, Y., Jia, L., Chen, H., Wei, X. (2013). Zinc-induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **89**, 150-157.
- Li, X., Yang, Y., Zhang, J., Jia, L., Li, Q., Zhang, T., Qiao, K., Ma, S. (2012). Zinc induced phytotoxicity mechanism involved in root growth of Triticum aestivum L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **86**, 198-203.
- Lim, S., Kim, Y. H., Kim, S. H., Kwon, S. Y., Lee, H. S., Kim, J. S., Cho, K. Y., Paek, K. Y., Kwak, S. S. (2007). Enhanced tolerance of transgenic sweetpotato plants that express both CuZnSOD and APX in chloroplasts to methyl viologen-mediated oxidative stress and chilling. *Molecular Breeding* **19**, 227–239.
- Lin, Y.-F., Aarts, M. M. (2012). The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 3187-3206.
- Liu, D., Zou, J., Meng, Q., Zou, J., Jiang, W. (2009a). Uptake and accumulation and oxidative stress in garlic (*Allium sativum* L.) under lead phytotoxicity. *Ecotoxicology* **18**.
- Liu, D., Zou, J., Wang, M., Jiang, W. (2008). Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in *Amaranthus viridis* L. *Bioresour Technol* **99**, 2628-36.



- Liu, T., Liu, S., Guan, H., Ma, L., Chen, Z., Gu, H. (2009b). Transcriptional profiling of Arabidopsis seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *Journal Environmental and Experimental Botany* **67**, 377–386.
- Liu, X., Chen, J., Wang, G.-H., Wang, W.-H., Shen, Z.-J., Luo, M.-R., Gao, G.-F., Simon, M., Ghoto, K., Zheng, H.-L. (2016). Hydrogen sulfide alleviates zinc toxicity by reducing zinc uptake and regulating genes expression of antioxidative enzymes and metallothioneins in roots of the cadmium/zinc hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Plant and Soil* **400**, 177-192.
- Llorach, R., Martínez-Sánchez, A., Tomás-Barberán, F., Gil, M., Ferreres, F. (2008). Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry* **108**, 1028–1038.
- Lopez-Martin, M. C., Becana, M., Romero, L. C., Gotor, C. (2008). Knocking out cytosolic cysteine synthesis compromises the antioxidant capacity of the cytosol to maintain discrete concentrations of hydrogen peroxide in Arabidopsis. *Plant Physiology* **147**, 562-572.
- Lukaszewicz, M., Matysiak-Kata, I., Skala, J., Fecka, I., Cisowski, W., Szopa, J. (2004). Antioxidant capacity manipulation in transgenic potato tuber by changes in phenolic compounds content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 1526–1533.
- Luna, M. C., Tudela, J. A., Martínez-Sánchez, A., Allende, A., Marín, A., Gil, M. I. (2012). Long-term deficit and excess of irrigation influences quality and browning related enzymes and phenolic metabolism of fresh-cut iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Postharvest Biology and Technology* **73**, 37-45.
- MacFarlane, G. R., Burchett, M. D. (2001). Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin* **42**, 233-240.
- Madhusudhan, R., Ishikawa, T. I., Sawa, Y., Shigeoka, S., Shibata, H. (2003). Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. *Physiologia Plantarum* **117**, 550–557.
- Maheshwari, R., Dubey, R. S. (2009). Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. *Plant Growth Regulation* **59**, 37-49.
- Malacrida, C., Valle, E. M., Boggio, S. B. (2006). Postharvest chilling induces oxidative stress response in the dwarf tomato cultivar Micro-Tom. *Physiologia Plantarum* **127**, 10-18.
- Maldonado-Magaña, A., Favela-Torres, E., Rivera-Cabrera, F., Volke-Sepulveda, T. L. (2011). Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant Soil* **339**, 377–389.
- Małacka, A., Piechalak, A., Tomaszewska, B. (2009). Reactive oxygen species production and antioxidative defense system in pea root tissues treated with lead ions: the whole roots level. . *Acta Physiologiae Plantarum* **31**, 1053–1063.
- Maleva, M. G., Nekrasova, G. F., Malec, P., Prasad, M. N. V., Strzałka, K. (2009). Ecophysiological tolerance of *Elodea canadensis* to nickel exposure. . *Chemosphere* **77**, 393–398.
- Martins, L., Mourato, M., Baptista, S., Reis, R., Carvalheiro, F., Almeida, A., Fevereiro, P., Cuypers, A. (2014). Response to oxidative stress induced by cadmium and copper in tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) engineered with the trehalose-6-phosphate synthase gene (AtTPS1). *Acta Physiologiae Plantarum* **36**, 755-765.

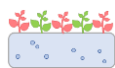


- Martins, L., Reis, R., Moreira, I., Pinto, F., Sales, J., Mourato, M. (2013). Antioxidative response of plants to oxidative stress induced by Cadmium. In "Cadmium - Characteristics, Sources of Exposure, Health and Environmental Effects" (M. Hasanuzzaman and M. Fujita, eds.), pp. 369. Nova Publishers, New York.
- Martins, L. L., Mourato, M. P., Cardoso, A. I., Pinto, A. P., Mota, A. M., Goncalves, M. d. L. S., de Varennes, A. (2011). Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**, 1375-1383.
- Mates, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology *Biog Amines* **16** 53–62.
- Meriga, B., Reddy, B. K., Rao, K. R., Reddy, L. A., Kishor, P. B. K. (2004). Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology* **161**, 63–68.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4197–4220.
- Michael, P. I., Krishnaswamy, M. (2011). The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **74**, 171-177.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ. Stud.* **15** 523–530.
- Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., Lüthje, S. (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews* **3**, 173-193.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment* **33**, 453-467.
- Milone, M. T., Sgherri, C., Clijsters, H., Navari-Izzo, F. (2003). Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* **50**, 265-276.
- Mishra, P., Prakash, V. (2010). Response of non-enzymatic antioxidants to zinc induced stress at different pH in Glycine max L. cv. Merrill. *Academic Journal of Plant Sciences* **3**, 1-10.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Kumar, R., Seth, C. S., Gupta, D. K. (2006). Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* **65**, 1027–1039.
- Mishra, S., Tripathi, R. D., Srivastava, S., Dwivedi, S., Trivedi, P. K., Dhankher, O. P., Khare, A. (2009). Thiol metabolism play significant role during cadmium detoxification by *Ceratophyllum demersum* L. *Bioresource Technology* **100**, 2155-2161.
- Mithofer, A., Schulze, B., Boland, W. (2004). Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters* **566**, 1-5.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.

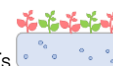


- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* **16**, 300-309.
- Mittler, R., Zilinskas, B. A. (1991). Purification and Characterization of Pea Cytosolic Ascorbate Peroxidase. *Plant Physiology* **97**, 962-968.
- Mobin, M., Khan, N. A. (2007). Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology* **164**, 601-610.
- Mohamed, A. A., Castagna, A., Ranieri, A., Sanità di Toppi, L. (2012). Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **57**, 15-22.
- Moller, I. M., Jensen, P. E., Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 459-481.
- Møller, I. M., Jensen, P. E., Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**.
- Monteiro, M. S., Santos, C., Soares, A. M. V. M., Mann, R. M. (2009). Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**, 811-818.
- Montes-Holguin, M. O., Peralta-Videa, J. R., Meitzner, G., Martinez-Martinez, A., de la Rosa, G., Castillo-Michel, H. A., Gardea-Torresdey, J. L. (2006). Biochemical and spectroscopic studies of the response of *Convolvulus arvensis* L. to chromium(III) and chromium(VI) stress. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**, 220-226.
- Moreira, I. N., Mourato, M. P., Reis, R., Martins, L. L. (2015). Oxidative stress induced by cadmium and copper in *Brassica rapa* leaves: indicators of stress, oxidative damage and antioxidant mechanisms. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **In press**.
- Moreira, O. C., Rios, P. F., Barrabin, H. (2005). Inhibition of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase by CrATP. LaATP but not CrATP stabilizes the Ca<sup>2+</sup>-occluded state. *BBA Bioenerg* **3**, 411-419.
- Morina, F., Jovanovic, L., Mojovic, M., Vidovic, M., Pankovic, D., Jovanovic, S. V. (2010). Zinc-induced oxidative stress in *Verbascum thapsus* is caused by an accumulation of reactive oxygen species and quinyhydrone in the cell wall. *Physiol Plant* **140**, 209-224.
- Mourato, M., Moreira, I., Leitão, I., Pinto, F., Sales, J., Martins, L. (2015). Effect of Heavy Metals in Plants of the Genus *Brassica*. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 17975.
- Mourato, M., Reis, R., Martins, L. (2012). Characterization of Plant Antioxidative System in Response to Abiotic Stresses: A Focus on Heavy Metal Toxicity. In "Advances in Selected Plant Physiology Aspects" (G. Montanaro and B. Dichio, eds.), pp. 23-44. Intech, Rijeka.
- Mozafariyan, M., Kamelmanesh, M. M., Hawrylak-Nowak, B. (2016). Ameliorative effect of selenium on tomato plants grown under salinity stress. *Archives of Agronomy and Soil Science* **62**, 1368-1380.
- Muhammad, S. A. A., Muhammad, A. (2012). "Essential roles and hazardous effects of nickel in plants. ."



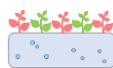


- Mulabagal, V., Ngouajio, M., Nair, A., Zhang, Y., Gottumukkala, A., Nair, M. (2010). In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chemistry* **118**, 300–306.
- Nagajyoti, P., Lee, K., Sreekanth, T. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* **8**, 199-216.
- Nagalakshmi, N., Prasad, M. N. V. (2001). Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science* **160**, 291-299.
- Nakano, Y., Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology* **28**, 131–140.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J. P. (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* **129**, 185-195.
- Neill, O., Gould, S. (2003). Anthocyanins in leaves: Light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology* **30**, 865-873.
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 388-395.
- Nocito, F. F., Lancilli, C., Crema, B., Fourcroy, P., Davidian, J. C., Sacchi, G. A. (2006). Heavy metal stress and sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiol* **141**, 1138-48.
- Noctor, G., Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 249-279.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., Foyer, C. H. (2011). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, no-no.
- Nouairi, I., Ben Ammar, W., Ben Youssef, N., Ben Miled, D. D., Ghorbal, M., Zarrouk, M. (2009). Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **31**, 237-247.
- Nouairi, I., Ben Ammar, W., Ben Youssef, N., Daoud, D. B., Ghorbal, M. H., Zarrouk, M. (2006). Comparative study of cadmium effects on membrane lipid composition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* leaves. *Plant Science* **170**, 511-519.
- Oh, M.-M., Carey, E. E., Rajashekar, C. B. (2009a). Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 578-583.
- Oh, M.-M., Trick, H. N., Rajashekar, C. B. (2009b). Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology* **166**, 180-191.
- Panda, S. K. (2003). Heavy-metal phytotoxicity induces oxidative stress in a moss, *Taxithellium* sp. *Current Science* **84**, 631-633.
- Panda, S. K. (2007). Chromium mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of developing rice seedlings. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1419–1428.
- Panda, S. K., Choudhury, S. (2005). Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**, 95-102.
- Pandey, N., Sharma, C. P. (2002). Effect of heavy metals  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science* **163**, 753-758.
- Pandey, N., Sharma, C. P. (2003). Chromium interference in iron nutrition and water relations of cabbage. *Environmental and Experimental Botany* **49**, 195-200.

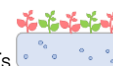


- Pandey, V., Dixit, V., Shyam, R. (2005). Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere* **61**, 40–47.
- Pandey, V., Dixit, V., Shyam, R. (2009). Chromium effect on ROS generation and detoxification in pea (*Pisum sativum*) leaf chloroplasts. *Protoplasma* **236**, 85–95.
- Parlak, K. U., Yilmaz, D. D. (2012). Response of antioxidant defences to Zn stress in three duckweed species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **85**, 52–58.
- Passaia, G., Margis-Pinheiro, M. (2015). Glutathione peroxidases as redox sensor proteins in plant cells. *Plant Science* **234**, 22–26.
- Pawlak-Sprada, S., Arasimowicz-Jelonek, M., Podgorska, M., Deckert, J. (2011). Activation of phenylpropanoid pathway in legume plants exposed to heavy metals. Part I. Effects of cadmium and lead on phenylalanine ammonia-lyase gene expression, enzyme activity and lignin content. *Acta Biochim Pol* **58**, 211–6.
- Pereira, G. J. G., Molina, S. M. G., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2002). Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant and Soil* **239**, 123–132.
- Pérez-Chaca, M. V., Rodríguez-Serrano, M., Molina, A. S., Pedranzani, H. E., Zirulnik, F., Sandalio, L. M., Romero-Puertas, M. C. (2014). Cadmium induces two waves of reactive oxygen species in *Glycine max* (L.) roots. *Plant, Cell & Environment* **37**, 1672–1687.
- Pesko, M., Kral'ova, K., Blasko, J. (2012). Phytotoxic effects of trivalent chromium on Rapeseed plants. *Fresenius Environmental Bulletin* **21**, 761–768.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., Malecka, A. (2002). Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* **60**, 153–162.
- Pinto, F. R., Mourato, M. P., Sales, J. R., Moreira, I. N., Martins, L. L. (2017). Oxidative stress response in spinach plants induced by cadmium. *Journal of Plant Nutrition* **40**, 268–276.
- Piotrowska, A., Bajguz, A., Godlewska-Zyłkiewicz, B., Czerpak, R., Kaminska, M. (2009). Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). *Journal Environmental and Experimental Botany* **66**, 507–513.
- Pivato, M., Fabrega-Prats, M., Masi, A. (2014). Low-molecular-weight thiols in plants: Functional and analytical implications. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **560**, 83–99.
- Pompeu, G. B., Vilhena, M. B., Gratao, P. L., Carvalho, R. F., Rossi, M. L., Martinelli, A. P., Azevedo, R. A. (2016). Absciscic acid-deficient sit tomato mutant responses to cadmium-induced stress. *Protoplasma*.
- Potters, G., De Gara, L., Asard, H., Horemans, N. (2002). Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 537–548.
- Pourrut, B., Perchet, G., Silvestre, J., Cecchi, M., Guiresse, M., Pinelli, E. (2008). Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *J. Plant Physiol.* **165**, 571–579.
- Prasad, K. V. S. K., Saradhi, P. P., Sharmila, P. (1999). Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany* **42**, 1–10.

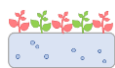




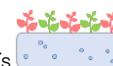
- Qadir, S., Qureshi, M. I., Javed, S., Abdin, M. Z. (2004). Genotypic variation in phytoremediation potential of Brassica juncea cultivars exposed to Cd stress. *Plant Science* **167**, 1171-1181.
- Qiao, X., Zheng, Z., Zhang, L., Wang, J., Shi, G., Xu, X. (2015). Lead tolerance mechanism in sterilized seedlings of Potamogeton crispus L.: Subcellular distribution, polyamines and proline. *Chemosphere* **120**, 179-187.
- Qing, X., Zhao, X., Hu, C., Wang, P., Zhang, Y., Zhang, X., Wang, P., Shi, H., Jia, F., Qu, C. (2015). Selenium alleviates chromium toxicity by preventing oxidative stress in cabbage (Brassica campestris L. ssp. Pekinensis) leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **114**, 179-189.
- Qiu, B., Zeng, F., Cai, S., Wu, X., Haider, S. I., Wu, F., Zhang, G. (2013). Alleviation of chromium toxicity in rice seedlings by applying exogenous glutathione. *Journal of Plant Physiology* **170**, 772-779.
- Radić, S., Babić, M., Škobić, S., Roje, V., Pevalek-Kozlina, B. (2010). Ecotoxicological effects of aluminum and zinc on growth and antioxidants in Lemna minor *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**, 336-342.
- Radotic, K., Ducic, T., Mutavdzic, D. (2000). Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* **44**, 105-113.
- Radyuk, M. S., Domanskaya, I. N., Shcherbakov, R. A., Shalygo, N. V. (2009). Effect of low above-zero temperature on the content of low-molecular antioxidants and activities of antioxidant enzymes in green barley leaves. *Russian Journal of Plant Physiology* **56**, 175-180.
- Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S. N., Mehrotra, S. (2004). Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of Ocimum tenuiflorum L. *Plant Science* **167**, 1159-1169.
- Ramakrishna, A., Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav* **6**, 1720-31.
- Ramakrishna, B., Rao, S. S. R. (2013). Preliminary studies on the involvement of glutathione metabolism and redox status against zinc toxicity in radish seedlings by 28-Homobrassinolide. *Environmental and Experimental Botany* **96**, 52-58.
- Randhawa, V. K., Zhou, F. X., Nalewajko, C., Kushner, D. J. (2001). Role of oxidative stress and thiol antioxidant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green alga Scenedesmus acutus f. alternans. *Can. J. Microbiol.* **47**, 987-993.
- Rao, M., Sresty, T. (2000). Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (Cajanus cajan (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science* **157** 113-128.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* **180**, 169-181.
- Reddy, A. M., Kumar, S. G., Jyonthsnakumari, G., Thimmanaik, S., Sudhakar, C. (2005). Lead induced changes in antioxidant metabolism of horse gram (Macrotyloma uniflorum (Lam.) Verdc.) and bengal gram (Cicer arietinum L.). *Chemosphere* **60**, 97-104.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L. (2010). Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in a halophytic Cd-hyperaccumulator, Arthrocnemum macrostachyum. *Journal of Hazardous Materials* **184**, 299-307.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Vecino-Bueno, I., Feldman, S. R. (2011). Accumulation and tolerance characteristics of chromium in a cordgrass Cr-



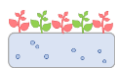
- hyperaccumulator, *Spartina argentinensis*. . *Journal of Hazardous Materials* **185**, 862–869.
- Rodríguez-Verástegui, L., Martínez-Hernández, G., Castillejo, N., Gómez, P., Artés, F., Artés-Hernández, F. (2015). Bioactive Compounds and Enzymatic Activity of Red Vegetable Smoothies During Storage. *Food and Bioprocess Technology*, 1-10.
- Romero-Puertas, M. C., Ortega-Galisteo, A. P., Rodríguez-Serrano, M., Sandalio, L. M. (2012). Insights into Cadmium Toxicity: Reactive Oxygen and Nitrogen Species Function. In "Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation" (D. K. Gupta and L. M. Sandalio, eds.), pp. 91-118. Springer, Heidelberg.
- Roychoudhury, A., Basu, S., Sengupta, D. (2012). Antioxidants and stress-related metabolites in the seedlings of two indica rice varieties exposed to cadmium chloride toxicity. *Acta Physiologiae Plantarum* **34**, 835-847.
- Rubio, M. C., Gonzalez, E. M., Minchin, F. R., Webb, K. J., Arrese-Igor, C., Ramos, J., Becana, M. (2002). Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum* **115**, 531-540.
- Rui, H., Chen, C., Zhang, X., Shen, Z., Zhang, F. (2016). Cd-induced oxidative stress and lignification in the roots of two *Vicia sativa* L. varieties with different Cd tolerances. *Journal of Hazardous Materials* **301**, 304-313.
- Saed-Moucheshi, A., Shekoofa, A., Pessarakli, M. (2013). Reactive Oxygen Species (ROS) Generation and Detoxifying in Plants. *Journal of Plant Nutrition* **37**, 1573-1585.
- Sagardoy, R., Morales, F., López-Millán, A. F., Abadía, A., Abadía, J. (2009). Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biology* **11**, 339–350.
- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and pro-oxidant activities: phenolics induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology and Industrial Health* **177**, 67–80.
- Samantary, S. (2002). Biochemical responses of Cr-tolerant and Cr-sensitive mung bean cultivars grown on varying levels of chromium. *Chemosphere* **47**, 1065-72.
- Sánchez-González, M. J., Schouten, R. E., Tijssens, L. M. M., Sánchez-Guerrero, M. C., Medrano, E., del Rio-Celestino, M., Lorenzo, P. (2016). Salinity and ripening on/off the plant effects on lycopene synthesis and chlorophyll breakdown in hybrid Raf tomato. *Scientia Horticulturae* **211**, 203-212.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C., del Rio, L. A. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2115-2126.
- Sanita di Toppi, L., Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* **41**, 105-130.
- Santos, J. Q. (2002). "Fertilização: fundamentos da utilização dos adubos e correctivos," Publicações Europa-América, Mem-Martins, Portugal.
- Sbartai, H., Djebbar, M., Sbartai, I., Berrabbah, H. (2012). Bioaccumulation of cadmium and zinc in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Comptes Rendus Biologies* **335**, 585-593.
- Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* **101**, 7–12.



- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**, 995-1014.
- Schrader, M., Fahimi, H. (2004). Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* **122** 383–393.
- Schuller, D. J., Ban, N., Van Huystee, R. B., McPherson, A., Poulos, T. L. (1996). The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure* **4**, 311–321.
- Schutzendubel, A., Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1351-1365.
- Schutzendubel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L., Polle, A. (2001). Cadmium-Induced Changes in Antioxidative Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in Scots Pine Roots. *Plant Physiology* **127**, 887-898.
- Scoccianti, V., Bucchini, A. E., Iacobucci, M., Ruiz, K. B., Biondi, S. (2016). Oxidative stress and antioxidant responses to increasing concentrations of trivalent chromium in the Andean crop species *Chenopodium quinoa* Willd. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **133**, 25-35.
- Scoccianti, V., Crinelli, R., Tirillini, B., Mancinelli, V., Speranza, A. (2006). Uptake and toxicity of Cr(III) in celery seedlings. *Chemosphere* **64**, 1695-1703.
- Semchuk, N. M., Lushchak, O. V., Falk, J., Krupinska, K., Lushchak, V. I. (2009). Inactivation of genes, encoding tocopherol biosynthetic pathway enzymes, results in oxidative stress in outdoor grown *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 384–390.
- Seregin, I. V., Kozhevnikova, A. D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **53**, 257-277.
- Shah, K., Nahakpam, S. (2012). Heat exposure alters the expression of SOD, POD, APX and CAT isozymes and mitigates low cadmium toxicity in seedlings of sensitive and tolerant rice cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* **57**, 106-113.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International* **31**, 739-753.
- Shanker, A. K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandrashekar, C. N., Pathmanabhan, G. (2004). Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Science* **166**, 1035-1043.
- Shanker, A. K., Djanaguiraman, M., Venkateswarlu, B. (2009). Chromium interactions in plants: current status and future strategies. *Metallomics* **1**, 375–383.
- Shanker, K., Pathmanabhan, G. (2004). Speciation dependant antioxidative response in roots and leaves of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv CO 27) under Cr(III) and Cr(VI) stress. *Plant and Soil* **265**, 141–151.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Lu, Z. H., Kang, C. M. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences* **4**, 8–14.
- Sharma, P., Dubey, R. S. (2004). Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Science* **167**, 541-550.

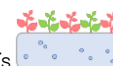


- Sharma, P., Dubey, R. S. (2005a). Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation* **46**, 209–221.
- Sharma, P., Dubey, R. S. (2005b). Lead toxicity in plants. . *Braz. J. Plant Physiol.* **17**, 35-52.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions - Review Article. *Journal of Botany*, 1-26.
- Sharma, S. S., Dietz, K.-J. (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science* **14**, 43-50.
- Siedlecka, A. (1995). Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **64**, 265-272.
- Singh, H., Mahajan, P., Kaur, S., Batish, D., Kohli, R. (2013). Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environmental Chemistry Letters* **11**, 229-254.
- Singh, H. P., Kaur, G., Batish, D. R., Kohli, R. K. (2011). Lead (Pb)-inhibited radicle emergence in *Brassica campestris* involves alterations in starch-metabolizing enzymes. *Biol Trace Elem Res* **144**, 1295-301.
- Singh, R., Tripathi, R. D., Dwivedi, S., Kumar, A., Trivedi, P. K., Chakrabarty, D. (2010). Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system. *Bioresource Technology* **101**, 3025–3032.
- Singh, U. V., Abhishek, A., Bhaskar, M., Tandan, N., Ansari, N. G., Singh, N. P. (2015). Phyto-extraction of heavy metals and biochemical changes with *Brassica nigra* L. grown in rayon grade paper mill effluent irrigated soil. *Bioinformation* **11**, 138-144.
- Sinha, P., Dube, B. K., Srivastava, P., Chatterjee, C. (2006). Alteration in uptake and translocation of essential nutrients in cabbage by excess lead. *Chemosphere* **65**, 651-656.
- Sinha, S., Saxena, R., Singh, S. (2005). Chromium induced lipid-peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. *Chemosphere* **58**, 595-604.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., Vangronsveld, J. (2005). Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 437-444.
- Smeets, K., Ruytinx, J., Semane, B., Van Bellegghem, F., Remans, T., Van Sanden, S., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2008). Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany* **63**, 1-8.
- Smirnoff, N., Running, J. A., Gatzek, S. (2004). Ascorbate biosynthesis: a diversity of pathways. In "Vitamin C: Its Functions and Biochemistry in Animals and Plants" (B. S. Publishers, ed.), pp. 7–29, New York, NY, USA.
- Soares, C., Sousa, A., Pinto, A., Azenha, M., Teixeira, J., Azevedo, R. A., Fidalgo, F. (2016). Effect of 24-epibrassinolide on ROS content, antioxidant system, lipid peroxidation and Ni uptake in *Solanum nigrum* L. under Ni stress. *Environmental and Experimental Botany* **122**, 115-125.
- Sobrino-Plata, J., Meyssen, D., Cuypers, A., Escobar, C., Hernández, L. (2014). Glutathione is a key antioxidant metabolite to cope with mercury and cadmium stress. *Plant and Soil*, 1-13.

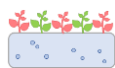


- Song, W.-Y., Mendoza-Cózatl, D. G., Lee, Y., Schroeder, J. I., Ahn, S.-N., Lee, H.-S., Wicker, T., Martinoia, E. (2014). Phytochelatin–metal(loid) transport into vacuoles shows different substrate preferences in barley and Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment* **37**, 1192-1201.
- Srivastava, R. K., Pandey, P., Rajpoot, R., Rani, A., Dubey, R. S. (2014). Cadmium and lead interactive effects on oxidative stress and antioxidative responses in rice seedlings. *Protoplasma* **251**, 1047-65.
- Srivastava, S., Dubey, R. S. (2011). Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. *Plant Growth Regulation* **64**, 1–16.
- Subrahmanyam, D. (2008). Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Photosynthetica* **46**, 339–345.
- Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzalka, K., Prasad, M. N. V. (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 985-999.
- Takahama, U., Oniki, T. (1997). A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum* **101**, 845–852.
- Tang, J., Xu, J., Wu, Y., Li, Y., Tang, Q. (2012). Effects of high concentration of chromium stress on physiological and biochemical characters and accumulation of chromium in tea plant (*Camellia sinensis* L.). *African Journal of Biotechnology* **11**, 2248-2255.
- Terzi, H., Yildiz, M. (2014). Variations in chromium tolerance and accumulation among canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **93**, 113-9.
- Tiwari, K. K., Dwivedi, S., Singh, N. K., Rai, U. N., Tripathi, R. D. (2009). Chromium (VI) induced phytotoxicity and oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.): biochemical changes and translocation of essential nutrients. *Journal of Environmental Biology* **30**, 389–394.
- Torres, M. A. (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* **138**, 414-429.
- Vajpayee, P., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Ali, M. B., Singh, S. N. (2000). Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere* **41**, 1075-1082.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* **12**, 1161–1208.
- van Doorn, W. G., Ketsa, S. (2014). Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase. *Postharvest Biology and Technology* **95**, 64-69.
- Varennes, A. (2003). "Produtividade dos Solos e Ambiente," Escolar Editora.
- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H. (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* **181**, 759–776.
- Verma, S., Dubey, R. S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* **164**, 645-655.
- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Hitmi, A. (2007). Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. *JChemosphere* **68**, 1563–1575.
- Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies* **55**.
- Wang, C., Zhang, S. H., Wang, P. F., Hou, J., Zhang, W. J., Li, W., Lin, Z. P. (2009). The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere* **75**, 1468–1476.





- Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* **2**, 388–393.
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 218-23.
- Wojas, S., Ruszcynska, A., Bulska, E., Wojciechowski, M., Antosiewicz, D. M. (2007). Ca<sup>2+</sup>-dependent plant response to Pb<sup>2+</sup> is regulated by LCT1. . *Environmental Pollution* **147**, 584–592.
- Wu, D., Yamaji, N., Yamane, M., Kashino-Fujii, M., Sato, K., Feng Ma, J. (2016). The HvNramp5 Transporter Mediates Uptake of Cadmium and Manganese, But Not Iron. *Plant Physiology* **172**, 1899-1910.
- Xiong, Z., Zhao, F., Li, M. (2006). Lead toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr.: effect on nitrate assimilation and growth. . *Environ. Toxicol.* **21**, 147–153.
- Xu, B., Yu, S., Ding, J., Wu, S., Ma, J. (2015). Metal-Dependent Root Iron Plaque Effects on Distribution and Translocation of Chromium and Nickel in Yellow Flag (*Iris pseudacorus* L.). *International Journal of Phytoremediation* **17**, 175-181.
- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* **76**, 167-179.
- Yu, F., Liu, K., Li, M., Zhou, Z., Deng, H., Chen, B. (2012). Effects of Cadmium on Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidative Defences of Rice (*Oryza Sativa* L.). *International Journal of Phytoremediation* **15**, 513-521.
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Hayat, S., Ahmad, A. (2011). Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **86**, 1-17.
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Varshney, P., Ahmad, A. (2012). Salicylic acid minimizes nickel and/or salinity-induced toxicity in Indian mustard (*Brassica juncea*) through an improved antioxidant system. . *Environmental Science and Pollution Research* **19**, 8–18.
- Zaefyzadeh, M., Quliyev, R. A., Babayeva, S. M., Abbasov, M. A. (2009). The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces. *Turkish Journal of Biology* **33**, 1-7.
- Zaimoglu, Z., Koksai, N., Basci, N., Kesici, M., Gulen, H., Budak, F. (2011). Antioxidative enzyme activities in *Brassica juncea* L. and *Brassica oleracea* L. plants under chromium stress. *Journal of Food Agriculture & Environment* **9**, 676-679.
- Zeng, F., Wu, X., Qiu, B., Wu, F., Jiang, L., Zhang, G. (2014). Physiological and proteomic alterations in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under hexavalent chromium stress. *Planta* **240**, 291-308.
- Zeng, F. R., Qiu, B. Y., Wu, X. J., Niu, S. Z., Wu, F. B., Zhang, G. P. (2012). Glutathione-mediated alleviation of chromium toxicity in rice plants. *Biological Trace Element Research* **255**–63.
- Zhang, F. Q., Wang, Y. S., Lou, Z. P., Dong, J. D. (2007). Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandeliacandel* and *Bruguieragy mnorrhiza*). *Chemosphere* **67**.
- Zhang, Z., Chang, X. X., Zhang, L., Li, J. M., Hu, X. H. (2016). Spermidine application enhances tomato seedling tolerance to salinity-alkalinity stress by modifying chloroplast antioxidant systems. *Russian Journal of Plant Physiology* **63**, 461-468.



- Zhao, F. J., Jiang, R. F., Dunham, S. J., McGrath, S. P. (2006). Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* **172**, 646–654.
- Zhao, H., Wu, L., Chai, T., Zhang, Y., Tan, J., Ma, S. (2012). The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *Journal of Plant Physiology* **169**, 1243-1252.





# Capítulo VI

**Avaliação do efeito  
da adição de  
corretivos orgânicos  
em solo**





## Índice

Índice .....	495
Índice de Figuras.....	497
Índice de Tabelas .....	501
Resumo.....	503
Capítulo VI - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE CORRETIVOS ORGÂNICOS EM SOLO .....	505
6.1. Objetivo .....	505
6.2. Introdução.....	505
6.2.1. Contaminação dos solos .....	505
6.2.2. Dinâmica dos EPTs no solo.....	511
6.2.2.1. Cádmio .....	512
6.2.2.1.1. Cádmio no meio ambiente.....	512
6.2.2.1.2. Biodisponibilidade e especiação de Cd no solo .....	513
6.2.2.1.3. Avaliação de risco para a saúde .....	515
6.2.2.2. Crômio .....	517
6.2.2.2.1. Crômio no meio ambiente.....	517
6.2.2.2.2. Biodisponibilidade e especiação de Cr no solo .....	519
6.2.2.2.3. Avaliação de risco para a saúde .....	520
6.2.2.3. Chumbo .....	521
6.2.2.3.1. Chumbo no meio ambiente.....	521
6.2.2.3.2. Biodisponibilidade e especiação de Pb no solo .....	522
6.2.2.3.3. Avaliação de risco para a saúde .....	524
6.2.2.4. Níquel .....	526
6.2.2.4.1. Níquel no meio ambiente.....	526
6.2.2.4.2. Biodisponibilidade e especiação de Ni no solo .....	528
6.2.2.4.3. Avaliação de risco para a saúde .....	528
6.2.2.5. Zinco .....	529
6.2.2.5.1. Zinco no meio ambiente .....	529
6.2.2.5.2. Biodisponibilidade e especiação de Zn no solo .....	529
6.2.2.5.3. Avaliação de risco para a saúde .....	531
6.3. Materiais e métodos.....	532
6.3.1 Material Vegetal .....	532
6.3.2. Delineamento experimental .....	532
6.3.3. Instalação dos ensaios .....	537
6.3.4 Colheita, amostragem e conservação de amostras .....	538
6.3.5. Determinações analíticas .....	538
6.3.5.1. Acumulação de EPT .....	539
6.3.5.2. Índices para avaliação da toxicidade dos EPTs estudados .....	540
6.3.5.2.1. Ingestão diária estimada .....	540
6.3.5.2.2. Fator de transferência do solo.....	540
6.3.5.2.3. Índice de tolerância .....	541
6.3.6 Tratamento estatístico .....	541
6.4. Resultados e Discussão.....	542
6.4.1. Cádmio.....	543
6.4.1.1. Caracterização do solo artificialmente contaminado com Cd .....	543



6.4.1.2. Caracterização da acumulação de Cd em alface .....	544
6.4.1.3. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade....	549
6.4.1.4. Avaliação do risco associado à ingestão de Cd .....	552
6.4.1.5. Caracterização da resposta da planta.....	554
6.4.1.6. Avaliação da toxicidade induzida por Cd em solo .....	562
6.4.2. Crômio.....	566
6.4.2.1. Caracterização do solo artificialmente contaminado com Cr .....	566
6.4.2.2. Caracterização da acumulação de Cr em alface .....	568
6.4.2.3. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade....	571
6.4.2.4. Avaliação do risco associado à ingestão de Cr .....	573
6.4.2.5. Caracterização da resposta da planta.....	575
6.4.2.6. Avaliação da toxicidade induzida por Cr.....	584
6.4.3. Chumbo.....	588
6.4.3.1. Caracterização do solo artificialmente contaminado com Pb.....	588
6.4.3.2. Caracterização da acumulação de Pb em alface .....	590
6.4.3.3. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade....	593
6.4.3.4. Avaliação do risco associado à ingestão de Pb.....	595
6.4.3.5. Caracterização da resposta da planta.....	597
6.4.3.6. Avaliação da toxicidade induzida por Pb .....	606
6.4.4. Níquel.....	610
6.4.4.1. Caracterização do solo artificialmente contaminado com Ni.....	610
6.4.4.2. Caracterização da acumulação de Ni em alface .....	612
6.4.4.3. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade....	615
6.4.4.4. Avaliação do risco associado à ingestão de Ni.....	617
6.4.4.5. Caracterização da resposta da planta.....	619
6.4.4.6. Avaliação da toxicidade induzida por Ni.....	627
6.4.5. Zinco .....	630
6.4.5.1. Caracterização do solo artificialmente contaminado com Zn.....	630
6.4.5.2. Caracterização da acumulação de Zn em alface.....	631
6.4.5.3. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade....	635
6.4.5.4. Avaliação do risco associado à ingestão de Zn.....	637
6.4.5.5. Caracterização da resposta da planta.....	639
6.4.5.6. Avaliação da toxicidade induzida por Zn .....	647
6.5. Conclusões .....	651
6.6. Referências Bibliográficas.....	654



## Índice de Figuras

<b>Figura 6.1</b> – Ciclo biogeoquímico de EPTs no sistema solo-planta-humano. As setas amarelas indicam disponibilização, as setas vermelhas indicam entrada na cadeia alimentar. Fonte: adaptado de Shahid et al. (2016a) e Bolan et al. (2014).	509
<b>Figura 6.2</b> – Distribuição de Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) na camada superficial de solos na Europa. Fonte: adaptado de Lado et al. (2008) (A) e de Tóth et al. (2016) (B).	514
<b>Figura 6.3</b> – Distribuição de Cr ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) na camada superficial de solos na Europa. Fonte: adaptado de Lado et al. (2008) (A) e de Tóth et al. (2016) (B).	518
<b>Figura 6.4</b> – Distribuição de Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) na camada superficial de solos na Europa. Fonte: adaptado de Lado et al. (2008) (A) e de Tóth et al. (2016) (B).	523
<b>Figura 6.5</b> – Distribuição de Ni ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) na camada superficial de solos na Europa. Fonte: adaptado de Lado et al. (2008) (A) e de Tóth et al. (2016) (B).	527
<b>Figura 6.6</b> – Distribuição de Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) na camada superficial de solos na Europa. Fonte: adaptado de Lado et al. (2008) (A).	530
<b>Figura 6.7</b> – Representação esquemática dos ensaios de avaliação do efeito da adição de corretivos orgânicos em solo.	534
<b>Figura 6.8</b> – Registo fotográfico ilustrativo dos ensaios de avaliação do efeito da adição de corretivos orgânicos em solo. A-plantas de alface previamente produzidas em alvéolos com turfa; B-plantas de alface em desenvolvimento; C-ensaio no carro porta-vasos; D-ensaio instalado na estufa de vegetação exterior.	537
<b>Figura 6.9</b> – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Cd e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com adição de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) concentração pseudototal de Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS) e (b) concentração de Cd na fração extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS).	545
<b>Figura 6.10</b> – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Cd e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com adição de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) pH, (b) matéria orgânica (%), (c) fósforo extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS) e (d) potássio extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS).	545
<b>Figura 6.11</b> – Concentração de Cd na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controlo), 1,5, 3, 6 e 12 $\text{mg Cd kg}^{-1}$ , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com adição de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).	546
<b>Figura 6.12</b> – Massa fresca da parte edível (a) e o registo fotográfico (b) de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo contaminado com Cd e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).	551
<b>Figura 6.13</b> – Parâmetros indicadores de stresse oxidativo (a) e danos nas membranas (b) e parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (c, d, e, f, g, h) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controlo), 1,5 e 12 $\text{mg Cd kg}^{-1}$ , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).	555
<b>Figura 6.14</b> – Atividade antioxidante total (a), enzimas antioxidantes (b,c,d,e,f) e concentração de ascorbato (g) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controlo), 1,5 e 12 $\text{mg Cd kg}^{-1}$ , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).	556
<b>Figura 6.15</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante de alface M4E contaminada com 1,5 e 12 $\text{mg Cd kg}^{-1}$ e sujeita a diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).	557
<b>Figura 6.16</b> – Análise em componentes principais realizada para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Cd ( $n=3$ ), considerando 6 variáveis: <i>parte edível</i> , <i>pseudototal</i> , <i>extraível</i> , <i>pH</i> , <i>m.o.</i> e <i>MF</i> .	563





- Figura 6.17** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Cd ( $n=3$ ). Estas duas componentes explicam 79,96 % da variabilidade. .... 564
- Figura 6.18** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Cr e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) concentração pseudototal de Cr ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) e (b) concentração de Cr na fração extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS). .... 567
- Figura 6.19** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Cr e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) pH, (b) matéria orgânica (%), (c) fósforo extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) e (d) potássio extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS). .... 567
- Figura 6.20** – Concentração de Cr ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controlo), 100, 200, 400 e 800  $\text{mg Cr kg}^{-1}$ , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .... 568
- Figura 6.21** – Massa fresca da parte edível (a) e o registo fotográfico (b) de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo contaminado com Cr e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .... 572
- Figura 6.22** – Parâmetros indicadores de stresse oxidativo (a) e danos nas membranas (b) e parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (c, d, e, f, g, h) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controlo), 100 e 800  $\text{mg Cr kg}^{-1}$ , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .... 576
- Figura 6.23** – Atividade antioxidante total (a), enzimas antioxidantes (b,c,d,e,f) e concentração de ascorbato (g) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controlo), 100 e 800  $\text{mg Cr kg}^{-1}$ , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .... 577
- Figura 6.24** – Representação esquemática da resposta antioxidante de alface M4E contaminada com 100 e 800  $\text{mg Cr kg}^{-1}$  e sujeita a diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .... 578
- Figura 6.25** – Análise em componentes principais realizada para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Cr ( $n=3$ ), considerando 6 variáveis: *parte edível*, *pseudototal*, *extraível*, *pH*, *m.o.* e *MF*. .... 585
- Figura 6.26** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Cr ( $n=3$ ). Estas duas componentes explicam 81,39 % da variabilidade. .... 586
- Figura 6.27** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Pb e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) concentração pseudototal de Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) e (b) concentração de Pb na fração extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS). .... 589
- Figura 6.28** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Pb e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) pH, (b) matéria orgânica (%), (c) fósforo extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) e (d) potássio extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS). .... 589
- Figura 6.29** – Concentração de Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controlo), 200, 400, 600 e 1200  $\text{mg Pb kg}^{-1}$ , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .... 590
- Figura 6.30** – Massa fresca da parte edível (a) e o registo fotográfico (b) de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo contaminado com Pb e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .... 594
- Figura 6.31** – Parâmetros indicadores de stresse oxidativo (a) e danos nas membranas (b) e parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (c, d, e, f, g, h) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controlo), 150 e 1200  $\text{mg Pb kg}^{-1}$ , com diferentes



modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .....	598
<b>Figura 6.32</b> – Atividade antioxidante total (a), enzimas antioxidantes (b,c,d,e,f) e metabólitos antioxidantes (g) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 150 e 1200 mg Pb kg <sup>-1</sup> , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .....	599
<b>Figura 6.33</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante de alface M4E contaminada com 150 e 1200 mg Pb kg <sup>-1</sup> e sujeita a diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .....	600
<b>Figura 6.34</b> – Análise em componentes principais realizada para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Pb (n=3), considerando 6 variáveis: <i>parte edível</i> , <i>pseudototal</i> , <i>extraível</i> , <i>pH</i> , <i>m.o.</i> e <i>MF</i> . .....	607
<b>Figura 6.35</b> – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Pb (n=3). Estas duas componentes explicam 74,01 % da variabilidade. ....	608
<b>Figura 6.36</b> – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Ni e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) concentração pseudototal de Ni (mg kg <sup>-1</sup> MS) e (b) concentração de Ni na fração extraível (mg kg <sup>-1</sup> MS). .....	611
<b>Figura 6.37</b> – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Ni e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) pH, (b) matéria orgânica (%), (c) fósforo extraível (mg kg <sup>-1</sup> MS) e (d) potássio extraível (mg kg <sup>-1</sup> MS). .....	611
<b>Figura 6.38</b> – Concentração de Ni (mg kg <sup>-1</sup> MS) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 37,5, 75, 150 e 300 mg Ni kg <sup>-1</sup> , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .....	613
<b>Figura 6.39</b> – Massa fresca da parte edível (a) e o registo fotográfico (b) de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo contaminado com Ni e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .....	616
<b>Figura 6.40</b> – Parâmetros indicadores de stresse oxidativo (a) e danos nas membranas (b) e parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (c, d, e, f, g, h) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 37,5 e 300 mg Ni kg <sup>-1</sup> , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .....	620
<b>Figura 6.41</b> – Atividade antioxidante total (a), enzimas antioxidantes (b,c,d,e,f) e metabólitos antioxidantes (g) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 37,5 e 300 mg Ni kg <sup>-1</sup> , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .....	621
<b>Figura 6.42</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante de alface M4E contaminada com 37,5 e 300 mg Ni kg <sup>-1</sup> e sujeita a diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .....	622
<b>Figura 6.43</b> – Análise em componentes principais realizada para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Ni (n=3), considerando 6 variáveis: <i>parte edível</i> , <i>pseudototal</i> , <i>extraível</i> , <i>pH</i> , <i>m.o.</i> e <i>MF</i> . .....	628
<b>Figura 6.44</b> – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Ni (n=3). Estas duas componentes explicam 70,55 % da variabilidade. ....	629
<b>Figura 6.45</b> – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Zn e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) concentração pseudototal de Zn (mg kg <sup>-1</sup> MS) e (b) concentração de Zn na fração extraível (mg kg <sup>-1</sup> MS). .....	632
<b>Figura 6.46</b> – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Zn e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume	





de cavalo (SE): (a) pH, (b) matéria orgânica (%), (c) fósforo extraível (mg kg <sup>-1</sup> MS) e (d) potássio extraível (mg kg <sup>-1</sup> MS). .....	632
<b>Figura 6.47</b> - Concentração de Zn (mg kg <sup>-1</sup> MS) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 150, 300, 600 e 1200 mg Zn kg <sup>-1</sup> , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .....	633
<b>Figura 6.48</b> – Massa fresca da parte edível (a) e o registo fotográfico (b) de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo contaminado com Zn e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .....	636
<b>Figura 6.49</b> – Parâmetros indicadores de stresse oxidativo (a) e danos nas membranas (b) e parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (c, d, e, f, g, h) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 150 e 1200 mg Zn kg <sup>-1</sup> , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .....	640
<b>Figura 6.50</b> – Atividade antioxidante total (a), enzimas antioxidantes (b,c,d,e,f) e metabolitos antioxidantes (g) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 150 e 1200 mg Zn kg <sup>-1</sup> , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .....	641
<b>Figura 6.51</b> – Representação esquemática da resposta antioxidante de alface M4E contaminada com 150 e 1200 mg Zn kg <sup>-1</sup> e sujeita a diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). .....	642
<b>Figura 6.52</b> – Análise em componentes principais realizada para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Zn (n=3), considerando 6 variáveis: <i>parte edível</i> , <i>pseudototal</i> , <i>extraível</i> , <i>pH</i> , <i>m.o.</i> e <i>MF</i> . .....	648
<b>Figura 6.53</b> – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Zn (n=3). Estas duas componentes explicam 82,67 % da variabilidade. ....	649



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 6.1</b> – Principais fontes e efeitos negativos na saúde humana devido à presença de EPTs. .	508
<b>Tabela 6.2</b> – Teores de EPTs presentes em solos, e em alguns casos em alface, em diferentes estudos realizados em solos de áreas urbanas em Portugal. ....	510
<b>Tabela 6.3</b> – Níveis máximos de Cd, no meio ambiente, permitidos pela legislação em vigor e outras <i>guidelines</i> .....	514
<b>Tabela 6.4</b> – Níveis máximos de Cr, no meio ambiente, permitidos pela legislação em vigor e outras <i>guidelines</i> .....	518
<b>Tabela 6.5</b> – Níveis máximos de Pb, no meio ambiente, permitidos pela legislação em vigor e outras <i>guidelines</i> .....	523
<b>Tabela 6.6</b> – Níveis máximos de Ni, no meio ambiente, permitidos pela legislação em vigor e outras <i>guidelines</i> .....	527
<b>Tabela 6.7</b> – Níveis máximos de Zn, no meio ambiente, permitidos pela legislação em vigor e algumas <i>guidelines</i> .....	530
<b>Tabela 6.8</b> – Caracterização inicial do solo, da zona do Almotivo, na Tapada da Ajuda. ....	533
<b>Tabela 6.9</b> – Concentrações de EPT aplicadas nos ensaios de avaliação do efeito da adição de corretivos orgânicos em solo.....	535
<b>Tabela 6.10</b> – Cronograma das tarefas realizadas para os ensaios de avaliação do efeito da adição de corretivos orgânicos em solo.....	537
<b>Tabela 6.11</b> – Determinações analíticas efetuadas, com material vegetal seco e fresco, para a planta adulta. ....	539
<b>Tabela 6.12</b> – Determinações analíticas efetuadas para o solo.....	539
<b>Tabela 6.13</b> – Fator de transferência do solo para a alface M4E que se desenvolveu em solo, sujeita a diferentes concentrações de Cd e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com adição de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).....	549
<b>Tabela 6.14</b> – Ingestão diária estimada da parte edível de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Cd e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). ....	552
<b>Tabela 6.15</b> – Parâmetros de avaliação do risco associado à exposição ao Cd para a saúde do ser humano.....	553
<b>Tabela 6.16</b> – Índice de tolerância da parte edível, de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Cd e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). ....	562
<b>Tabela 6.17</b> – Fator de transferência do solo para a alface M4E que se desenvolveu em solo, sujeita a diferentes concentrações de Cr e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). ....	570
<b>Tabela 6.18</b> – Ingestão diária estimada, da parte edível de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Cr e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). ....	574
<b>Tabela 6.19</b> – Parâmetros de avaliação do risco associado à exposição ao Cr para a saúde do ser humano.....	574
<b>Tabela 6.20</b> – Índice de tolerância da parte edível, de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Cr e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). ....	584
<b>Tabela 6.21</b> – Fator de transferência do solo para a alface M4E que se desenvolveu em solo, sujeita a diferentes concentrações de Pb e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). ....	593
<b>Tabela 6.22</b> – Ingestão diária estimada, da parte edível de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Pb e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).....	595



<b>Tabela 6.23</b> – Parâmetros de avaliação associados à exposição ao Pb para a saúde do ser humano. ....	596
<b>Tabela 6.24</b> – Índice de tolerância da parte edível, de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Pb e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). ....	606
<b>Tabela 6.25</b> – Fator de transferência do solo para a alface M4E que se desenvolveu em solo, sujeita a diferentes concentrações de Ni e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). ....	615
<b>Tabela 6.26</b> – Ingestão diária estimada, da parte edível de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Ni e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). ....	617
<b>Tabela 6.27</b> – Parâmetros de avaliação do risco associado à exposição ao Ni para a saúde do ser humano. ....	618
<b>Tabela 6.28</b> – Índice de tolerância da parte aérea, de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Ni e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). ....	627
<b>Tabela 6.29</b> – Fator de transferência do solo para a alface M4E que se desenvolveu em solo, sujeita a diferentes concentrações de Zn e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). ....	635
<b>Tabela 6.30</b> – Ingestão diária estimada, da parte edível de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Zn e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). ....	637
<b>Tabela 6.31</b> – Parâmetros de avaliação associados à exposição ao Zn para a saúde do ser humano. ....	638
<b>Tabela 6.32</b> – Índice de tolerância da parte aérea, de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Zn e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE). ....	648



## Resumo

Neste Capítulo é feita uma avaliação da potencial utilização de corretivos orgânicos naturais, pó de cortiça e estrume de cavalo, em diminuir a acumulação de Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn, pelas plantas de alface, em solos artificialmente contaminados com estes elementos. Tentar-se-á, assim, constituir uma forma alternativa de atenuar, futuramente, o índice de contaminação de solos.

Para se estudar de que modo o efeito da presença destes dois corretivos orgânicos afeta a acumulação de EPTs pelas plantas de alface delineou-se um ensaio em vasos, em condições controladas, e determinaram-se vários parâmetros que permitiram caracterizar o solo artificialmente contaminado (nomeadamente, o teor do elemento químico utilizado como contaminante em solo presente na fração pseudototal e extraível) e caracterizar a resposta da planta de alface face a estas condições experimentais. Para cada elemento foram utilizadas quatro concentrações nos solos (Cd: 1,5 a 12 mg kg<sup>-1</sup>; Cr: 100 a 800 mg kg<sup>-1</sup>; Pb: 150 a 1200 mg kg<sup>-1</sup>; Ni: 37,5 a 300 mg kg<sup>-1</sup>; Zn: 150 a 1200 mg kg<sup>-1</sup>).

Pode-se referir que é promissora a remediação de solos contaminados com cádmio pela adição destes corretivos orgânicos, uma vez que existe uma diminuição na quantidade de cádmio acumulada na parte edível da planta de alface. No caso do Cr, Pb, Ni e Zn, aparentemente, a presença destes corretivos orgânicos não tem influência no teor acumulado na parte edível. Nestes casos, deviam ter sido adicionadas quantidades mais elevadas de corretivos, apesar do ensaio prévio realizado, para se verificar se existe realmente influência na fração extraível e na quantidade de EPT acumulado pela planta.

O método utilizado para determinar a fração extraível (com o uso de CaCl<sub>2</sub>), não parece ser o mais adequado para relacionar os teores extraíveis de EPTs e os que são efetivamente acumulados pela planta de alface. Em estudos posteriores seria aconselhável a utilização de outros extratantes e adequar essa extração a cada elemento em estudo.

A concentração de EPT presente na parte edível da planta de alface ultrapassa os valores permitidos por lei, no caso do Cd e Pb, e os níveis normais para em plantas para o Cr, Ni e Zn (à exceção da contaminação com 150 e 300 mg Zn kg<sup>-1</sup>). No caso do cádmio e chumbo é possível verificar que os valores obtidos para todas as plantas contaminadas com estes EPTs ultrapassam o limite máximo permitido pela legislação em vigor para hortícolas de folha, podendo haver risco de contaminação da cadeia alimentar associado à exposição ao Cd e Pb para a saúde do ser humano. Nas plantas contaminadas com Cr, Ni e Zn, apesar dos níveis



presentes nas plantas de alface, não existe risco associado porque os valores de ingestão diária estimada obtidos são inferiores à dose de referência recomendada.

Através do presente estudo, é possível verificar que esta cultivar de alface não deve ser cultivada em solos contaminados principalmente com Cd e Pb, uma vez que não apresenta sintomas evidentes de toxicidade e acumula quantidades excessivas e prejudiciais destes elementos.



## **Capítulo VI - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE CORRETIVOS ORGÂNICOS EM SOLO**

### **6.1. Objetivo**

Com este Capítulo pretende-se verificar a hipótese de os corretivos orgânicos naturais diminuírem a acumulação de Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn, pelas plantas de alface, em solos artificialmente contaminados.

Estes materiais orgânicos, pela sua natureza, podem influenciar a biodisponibilidade dos elementos potencialmente tóxicos existentes nos solos e reduzir a sua acumulação pelas plantas, diminuindo a fitotoxicidade do elemento. Neste sentido, delinearam-se ensaios em vasos, em condições controladas, para se estudar de que modo o efeito da presença de dois corretivos orgânicos, pó de cortiça e estrume de cavalo seco, afeta a acumulação de elementos potencialmente tóxicos em solos contaminados.

O estrume de cavalo é comumente utilizado como adubo em hortas urbanas e a cortiça é largamente produzida em Portugal, logo tem uma grande quantidade de subprodutos que poderão ser utilizados na remediação dos solos, e até agora existem poucos estudos deste género com este corretivo. Tentar-se-á, assim, constituir uma forma alternativa de atenuar, futuramente, o índice de contaminação de solos.

Neste Capítulo vai ser também verificado em que medida cada elemento potencialmente tóxico e a adição dos diferentes corretivos orgânicos podem afetar a acumulação pela planta, os parâmetros vegetativos e a manifestação de sintomas visíveis de toxicidade. Posteriormente, vão-se identificar os mecanismos de resposta metabólica específicos da planta, subjacentes à toxicidade induzida pelos diferentes elementos, nestas condições experimentais.

### **6.2. Introdução**

#### **6.2.1. Contaminação dos solos**

O solo pode estar contaminado naturalmente ou através de atividades antropogénicas com elementos químicos e/ou substâncias que estão presentes em quantidades tóxicas (Sipter et al., 2008). Os poluentes normalmente presentes no meio urbano são, maioritariamente, de origem antropogénica, especialmente devido ao tráfego rodoviário, uso de terrenos com



anterior atividade industrial, deposição atmosférica, efluentes domésticos e águas residuais e corretivos orgânicos de má qualidade (Alloway, 2004). Por este motivo, uma das grandes preocupações ecológicas é a presença de um EPTs no ambiente (Khan et al., 2008b). Os metais não são biodegradáveis, persistem no ambiente por tempo indefinido e a sua remoção é difícil e cara (Nagajyoti et al., 2010). Embora a contaminação tenha sido bastante reduzida na maior parte dos países desenvolvidos, os solos urbanos ainda podem conter teores elevados de contaminantes resultantes de atividades antropogénicas anteriores e, em muitos países em desenvolvimento, essa contaminação permanece (Filippelli e Laidlaw, 2010; McClintock, 2015; Trujillo-González et al., 2016).

Existem três vias pelas quais os seres humanos estão expostos aos materiais do solo: (i) ingestão, (ii) respiração e (iii) absorção ou penetração pela pele. A ingestão pode ocorrer deliberadamente, conhecida como geofagia, ou incidentalmente, durante o contacto mão-a-boca (particularmente em crianças e mulheres grávidas) (Gundacker et al., 2017; Lar et al., 2015; von Lindern et al., 2016) ou quando os produtos hortofrutícolas crus são consumidos sem serem lavados de forma apropriada (Nabulo et al., 2012; Nabulo et al., 2010).

Para além disso, as plantas mais tolerantes absorvem e acumulam EPTs nas suas partes edíveis e podem não apresentar alterações visíveis. Sem esses sintomas de toxicidade visíveis, o consumo de hortofrutícolas cultivados em meios contaminados pode ser um risco para a saúde humana (Nagajyoti et al., 2010). As plantas podem absorver metais em diferentes concentrações dependendo de vários fatores como as propriedades específicas dos solos, do elemento químico, e para determinados EPTs, do seu estado de oxidação, e ainda da espécie de planta e das suas características fisiológicas (Hough et al., 2004a; Leake et al., 2009; Mourato et al., 2015; Szolnoki e Farsang, 2013).

Por estes motivos, Koch et al. (2012) fizeram referência ao conceito segurança do solo, que vai para além dos conceitos de qualidade e saúde do solo. Esta designação engloba aspetos económicos, sociais e políticos com o intuito de se colocarem as políticas relativas ao solo semelhantes às realizadas para a segurança da água e dos produtos alimentares (McBratney et al., 2014). Na **Tabela 6.1** encontram-se as principais fontes e efeitos negativos para a saúde humana resultantes da exposição aos EPTs em estudo no presente trabalho.

Na **Figura 6.1.** encontra-se representado o comportamento do ciclo biogeoquímico geral dos EPTs no sistema solo-planta-humano. Na **Figura 6.1-1** estão representadas as diferentes fontes naturais e antropogénicas que levam à acumulação de EPT no solo. Na **Figura 6.1-2** estão descritas as propriedades físico-químicas dos solos, que influenciam a complexação,





mobilidade e biodisponibilidade do EPT no solo. De seguida, ocorre a acumulação de EPT pelas plantas através da absorção pelas raízes (**Figura 6.1-3**) e, a posterior, translocação para a parte aérea (**Figura 6.1-4**) que depende de vários fatores, como o tipo de planta e a concentração de EPT aplicado. Por fim, os mecanismos de destoxificação da planta face ao stresse induzido pela presença do EPT (**Figura 6.1-5**), que foram descritos no **Capítulo V**, e os efeitos tóxicos resultantes (**Figura 6.1-6**), referidos, de forma aprofundada, no **Capítulo III** e **IV**.

Uma vez que os EPTs podem ter este efeito prejudicial, a única maneira efetiva de diminuir o risco para a saúde pública e para o ambiente é diminuir a sua exposição, sendo esta potencialmente maior em meio urbano. A agricultura urbana em solos contaminados tem ganho especial atenção para que sejam tomadas medidas preventivas ou corretivas apropriadas, para evitar riscos para a saúde associados à ingestão de EPTs através da cadeia alimentar (Barthel e Isendahl, 2013; Guitart et al., 2012; Turner, 2009).

Atualmente a agricultura urbana tem vindo a aumentar, sendo um dos principais fatores de planeamento das cidades no séc. XXI, com reconhecidos benefícios para a qualidade de vida das pessoas nas cidades (Dunnett e Qasim, 2000; Leake et al., 2009; Steffan et al., 2017; van den Berg et al., 2010).

Neste contexto, vários estudos em numerosos países têm demonstrado que, com muita frequência, os solos em meio urbano podem estar contaminados (Bretzel e Calderisi, 2006; Giusti, 2011; Imperato et al., 2003; Nabulo et al., 2012; Nabulo et al., 2011; Panagos et al., 2013), nomeadamente em Portugal (Cruz et al., 2014; Pinto e Ramos, 2008), e em particular no Distrito de Lisboa (Leitão et al., 2016a; Reis et al., 2014; Silva, 2015).

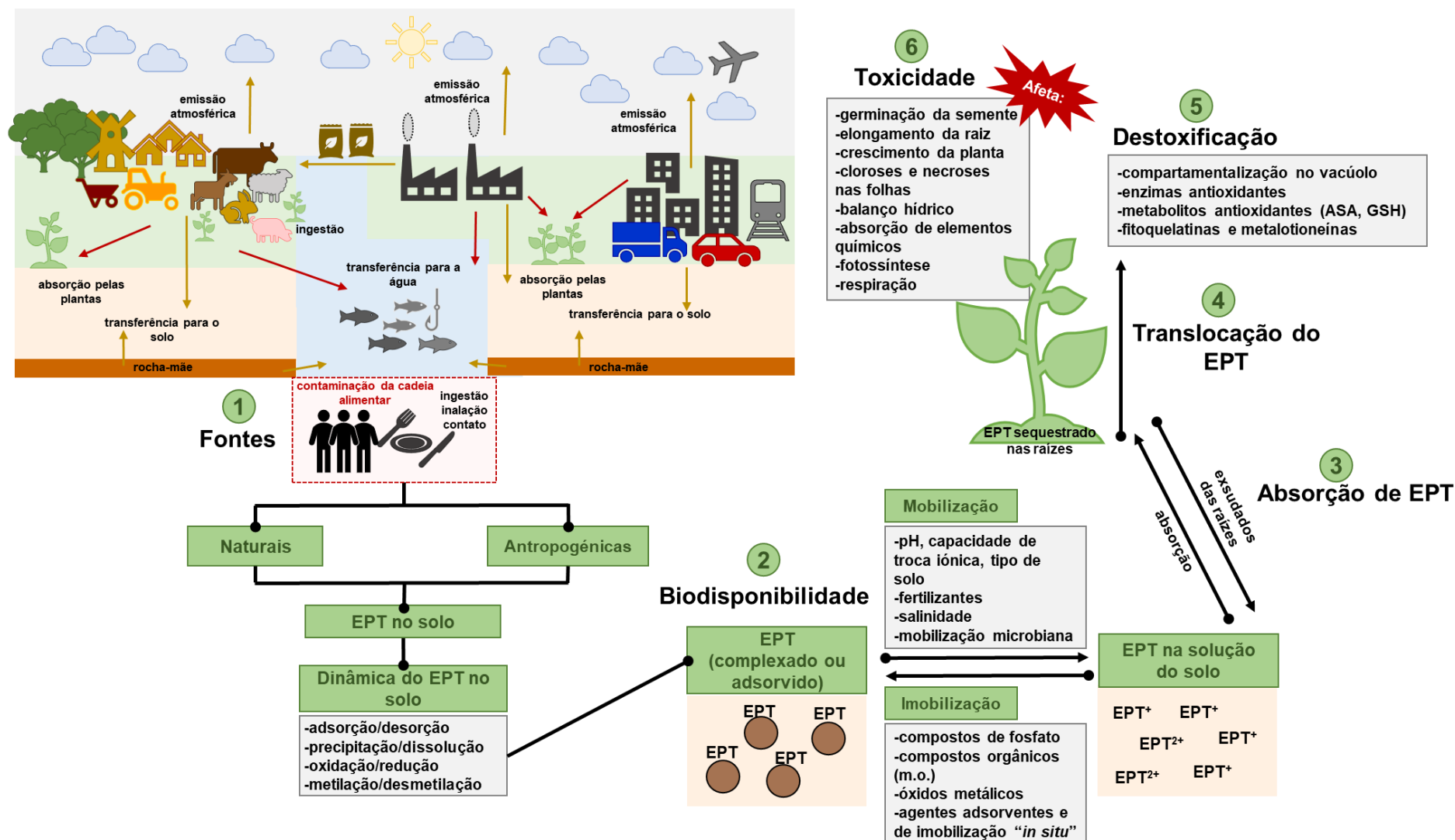
Na **Tabela 6.2** encontram-se os teores de EPTs presentes em solos e, em alguns casos em alface, em diferentes estudos realizados em áreas urbanas em Portugal.

A produção alimentar urbana tem aumentado e cada vez mais parcelas de solo são utilizadas para hortas urbanas (Barthel e Isendahl, 2013; Bechet et al., 2016; Jean-Soro et al., 2015; McBride et al., 2014; Mitchell et al., 2014). Estas hortas, para além de aparecerem com carácter precário e de forma espontânea, têm também surgido a partir de iniciativa das câmaras municipais e de outras entidades públicas ou privadas. Existem, porém, alguns inconvenientes como o risco associado à realização de práticas agrícolas menos corretas ou a ingestão de produtos cultivados em solos urbanos potencialmente contaminados (Abdu et al., 2012; Säumel et al., 2012; Szolnoki e Farsang, 2013).

**Tabela 6.1** – Principais fontes e efeitos negativos na saúde humana devido à presença de EPTs.

EPT	Principais fontes	Efeitos negativos na saúde humana
<b>Cd</b>	(i) extração mineira (está associado ao uso de minérios de Zn, Cu, Pb) e de combustíveis fósseis. (ii) através da inceneração de lixo urbano e industriais. (iii) presente em tintas e pigmentos. (iv) utilizado como estabilizante de plásticos, em processos de galvanização (revestimento) e baterias Ni-Cd. (v) práticas agrícolas: com a aplicação de adubos fosfatados e fertilizantes orgânicos.	(i) mutagénico, carcinogénico e teratogénico. (ii) disruptor endócrino. (iii) interfere com a regulação do cálcio nos sistemas biológicos. (iv) origina anemia crónica e insuficiência renal. (v) associado à doença óssea <i>itai-itai</i> . (vi) a exposição crónica é mais relevante do que uma elevada ingestão isolada. O Cd tem um longo tempo de meia-vida (15-20 anos) e o seu efeito manifesta-se maioritariamente em indivíduos com mais de 50 anos.
<b>Cr</b>	(i) utilização industrial muito difundida: indústria dos curtumes e metalúrgica. (ii) utilizado em processos de galvanização, produção de tintas e pigmentos, de celulose, papel e de aço inoxidável. (iii) também está presente em resíduos industriais, como cinzas. (iv) utilização agrícola de fertilizantes orgânicos.	(i) a inalação e retenção de Cr podem originar problemas respiratórios: asma, bronquite, pneumonia, inflamação da laringe e fígado, e aumento da incidência de cancro do pulmão. (ii) o contacto com a pele pode induzir alergias, dermatite e necrose dérmica. (iii) o efeito tóxico dos cromatos deve-se ao seu forte potencial oxidativo e à possibilidade de difusão através das membranas.
<b>Pb</b>	(i) emissão aérea pelos escapes dos veículos através da combustão da gasolina com Pb, quando não se utilizava combustíveis sem Pb, podendo ainda estar presente em solos urbanos próximos das vias rodoviárias. (ii) através de explorações mineiras e fundições, queima de carvão, descargas com lodo de esgoto, produção de plásticos e borracha e de baterias. (iii) presente em munições, pneus abandonados, tubagens, tintas à base de Pb, inseticidas. (iv) utilização agrícola de fertilizantes orgânicos.	(i) o seu envenenamento causa problemas nas crianças como alterações no desenvolvimento, perda de memória a curto-prazo, diminuição da inteligência, dificuldades na aprendizagem e problemas de coordenação. (ii) causa insuficiência renal, retardamento mental, anemia e aumenta o risco de doenças cardiovasculares.
<b>Ni</b>	(i) presente em utensílios com aço inoxidável: utensílios de cozinha, joalharia, moedas, instrumentos cirúrgicos e ligas de aço. (ii) uso industrial: muito utilizado na indústria química; processos de galvanização; catalisador na indústria química e alimentar; usado em baterias recarregáveis. (iii) utilização agrícola de fertilizantes orgânicos.	(i) a inalação pode causar cancro nos pulmões, peito, garganta e estômago. (ii) é tóxico para o sangue e sistema imunitário, órgãos reprodutivos, fígado, rins e pulmões. (iii) é neurotóxico e genotóxico. (iv) causa perda de cabelo e dermatite alérgica.
<b>Zn</b>	(i) utilizado em processos de galvanização (revestimento), baterias, ligas de Zn, pneus, produtos cosméticos e farmacêuticos. (ii) utilização agrícola de fertilizantes orgânicos.	(i) um excesso de dosagem pode originar fadiga, tonturas e letargias. (ii) náuseas, vômitos, diarreias, dor epigástrica. (iii) risco elevado de cancro da próstata.

Fonte: adaptado de Kotas e Stasicka (2000), Varennes (2003), Plum et al. (2010) e Ali et al. (2013).



**Figura 6.1** – Ciclo biogeoquímico de EPTs no sistema solo-planta-humano. As setas amarelas indicam disponibilização, as setas vermelhas indicam entrada na cadeia alimentar. Fonte: adaptado de Shahid et al. (2016a) e Bolan et al. (2014).



**Tabela 6.2** – Teores de EPTs presentes em solos, e em alguns casos em alface, em diferentes estudos realizados em solos de áreas urbanas em Portugal.

Local	Material	[EPT] (mg kg <sup>-1</sup> )				Referências Bibliográficas	
<b>Lisboa, Portugal</b>		<b>Cd</b>	<b>Pb</b>	<b>Ni</b>	<b>Cr</b>		
2ª Circular		0,38	11,68	72,12	58,62		
Belém		0,59	9,15	104,61	61,34		
Calçada de Carriche	Solo	0,46	11,88	78,52	37,73	(Silva, 2015)	
Marquês de Pombal		0,71	8,87	70,02	36,92		
Cabo Ruivo		0,25	6,86	13,71	36,71		
Monsanto		0,11	2,93	35,50	77,88		
<b>Braga, Portugal</b>		<b>Cd</b>	<b>Pb</b>		<b>Zn</b>		
	Alface	0,07	0,91		172		
Horta 4	Solo	< 0,17	81,6		239		
	Alface	0,13;0,21	0,70;0,99		80,8;69,9		
Horta 5	Solo	0,17	171		215	(Pinto e Ramos, 2008)	
	Alface	0,39;0,59	0,42;0,56		82,8;151		
Horta 6	Solo	0,17	137		221		
	Alface	0,06;0,05	8,62;3,44		76,6;75,6		
Horta 7	Solo	0,27	672		386		
	Alface	0,38;0,39	2,68;4,04		128;158		
Horta 8	Solo	2,93	1183		946		
<b>Porto, Portugal</b>		<b>Cd</b>	<b>Pb</b>	<b>Ni</b>	<b>Cr</b>	<b>Zn</b>	
Área urbana (Porto)		0,44	126	18	45	213	
fração pseudototal naturalmente presente no solo em Portugal		não disponível	45	52	80	107	
fração pseudototal em outras áreas urbanas em Portugal		-	4.8–561 (Lisboa) 13–817 (Viseu) 8–180 (Aveiro)	2.0–209 (Lisboa) 3.3–9.7 (Viseu) 2–12 (Aveiro)	1.0–172 (Lisboa); 6–17 (Viseu) 2–37 (Aveiro)	7–269 (Lisboa) 47–190 (Viseu) 13–6213 (Aveiro)	(Cruz et al., 2014)
fração pseudototal do solo em cidades industrializadas		1,30 (Turim) 0.65 ( <i>NewCastle</i> ); 0.92 (Berlim)	14–1440 (Turim) 12–1330 ( <i>Glasgow</i> )	80–830 (Turim) 18–130 ( <i>Glasgow</i> )	64–870 (Turim) 20–230 ( <i>Glasgow</i> )	56–880 (Turim) 54–1340 ( <i>Glasgow</i> )	
fração pseudototal do solo em outras cidades europeias		0.06–3.1 (Oslo); 0.3–2.0 (Atenas)	21–51 (Sevilha)	16–53 (Sevilha)	15–977 (Sevilha)	21–325 (Sevilha)	



### 6.2.2. Dinâmica dos EPTs no solo

A contaminação de um solo depende da rocha mãe que lhe deu origem e dos processos naturais de pedogênese que ocorreram. Os elementos potencialmente tóxicos podem estar presentes na estrutura de minerais, adsorvidos aos colóides, formando quelatos com a matéria orgânica (m.o.), e na solução do solo (Varennnes, 2003). Os íons metálicos podem ficar retidos nos solos através de reações de adsorção, precipitação e complexação, e podem ser removidos do solo através da sua absorção pelas plantas, lixiviação ou volatilização (Bolan et al., 2014).

As características do solo determinam que, para uma mesma quantidade total de elemento potencialmente tóxico, este possa estar mais ou menos disponível, podendo ser acumulado pela planta em quantidades que podem ser consideradas prejudiciais para a alimentação humana. Por vezes isto ocorre mesmo abaixo dos valores limite impostos no solo pela legislação ambiental relativa à valorização agrícola de certos resíduos, como é o caso das lamas de depuração (Decreto-Lei n.º 276 Decreto-lei (n.º 276/2009).

As propriedades do solo e a composição da solução do solo determinam o equilíbrio dinâmico entre os elementos metálicos presentes em solução e na fase sólida do solo. A concentração de elementos potencialmente tóxicos na solução do solo é influenciada pela natureza dos ligandos orgânicos e inorgânicos e pela reação do solo que afetam os processos de adsorção (Choppala et al., 2016). Deste modo, a biodisponibilidade no solo reflete a fração de EPTs que podem ser absorvidos pela planta, sendo controlada pelas características da sua matriz (Szolnoki e Farsang, 2013). As principais propriedades do solo que controlam a especiação, mobilidade e retenção dos EPTs são o pH, condições redox, m.o., presença de minerais com carbonatos e fosfatos, minerais argilosos, entre outros (Pelfrêne et al., 2012).

A imobilização de contaminantes pode ser conseguida principalmente através de reações de adsorção, precipitação e complexação que resultam na sua redistribuição da fase da solução do solo para a fase sólida, reduzindo assim a sua biodisponibilidade e transporte para o meio ambiente (Mahar et al., 2015). Neste sentido, uma forma de diminuir a especiação, migração e a biodisponibilidade dos metais no solo consiste em estabilizá-los, tornando-os menos disponíveis para as plantas e, por consequência, para a cadeia alimentar (El Khalil et al., 2016; Guo et al., 2006).

Com o objetivo de remediação dos solos e de diminuição da biodisponibilidade de EPT no solo, foi testado no presente trabalho, a utilização de materiais de origem florestal ou pecuária,



por serem materiais com locais de complexação e ligação para troca iônica, que podem funcionar como adsorventes. Vários trabalhos referem como modo de remediação dos solos a aplicação de adsorventes de EPTs e agentes de imobilização “*in situ*” tais como cinzas, lamas resultantes do tratamento de águas residuais, camadas mais externas de plantas lenhosas, partículas finas de madeira ou outros tipos de matérias orgânicas (Luo et al., 2015; Zhou e Haynes, 2010).

Neste trabalho foi utilizada a cortiça como uma alternativa ambientalmente sustentável e económica. Apesar de Portugal ser o maior produtor mundial de cortiça e o maior exportador mundial de produtos de cortiça (GPP, 2015; Pinto-Correia et al., 2010), existem poucos estudos que utilizam subprodutos de cortiça como um produto eficaz na remediação de solos contaminados com metais, existindo apenas estudos efetuados em culturas produzidas sem solo (Chubar et al., 2003; Mota et al., 2006).

Outro material testado neste trabalho foi o estrume de cavalo, dada a sua utilização muito comum em hortas urbanas para fertilizar os solos. A maioria dos produtos de estrume contêm baixos níveis de EPTs (Antonious et al., 2012; Bolan et al., 2014; Irshad et al., 2014; Wu et al., 2012).

#### **6.2.2.1. Cádmio**

##### **6.2.2.1.1. Cádmio no meio ambiente**

Apesar de o Cd ser um elemento escasso, pode ocorrer naturalmente na crosta terrestre e na água. O minério de Cd é principalmente produzido como subproduto da extração em minas, fundição e refinação de  $\text{ZnSO}_4$  (Rao et al., 2010). Por este motivo, existem alguns estudos que referem a presença de Cd em minas e fundições (Agnieszka et al., 2014). Os vulcões e a erosão das rochas são as principais fontes naturais de mobilização de Cd na crosta terrestre (Choppala et al., 2014).

Embora as concentrações naturais variem com o tipo de solo, as concentrações de Cd num solo não contaminado variam entre  $0,02\text{--}2,0 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  e podem ser esperadas maiores concentrações de Cd em solos que cobrem as rochas sedimentares ( $0,3 \text{ a } 15 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ) (Alloway, 2013).

A principal fonte de contaminação dos solos agrícolas com Cd, exceto alguns casos particulares, é a aplicação de fertilizantes fosfatados e orgânicos e estima-se que o Cd tenha aumentado 7-43 % como resultado dos últimos 100 anos de aplicação destes fertilizantes em



vários países da Europa (Áustria, Dinamarca, Finlândia, Grécia, Irlanda e Reino Unido) (Liu et al., 2012; UNEP, 2010).

Embora a deposição atmosférica tenha diminuído nos países desenvolvidos, continua a ser uma fonte importante de libertação de Cd nos solos agrícolas (2500-15000 ton Cd ano<sup>-1</sup>) (UNEP, 2010). A utilização de águas residuais para rega de culturas agrícolas, sem qualquer tratamento prévio, em áreas periurbanas é outra fonte importante de Cd (Abedi-Koupai et al., 2015; Shahid et al., 2013; Singh et al., 2010b). O principal consumo global de Cd deve-se à sua presença em baterias recarregáveis de Ni-Cd. No entanto, estas baterias têm sido, gradualmente eliminadas e substituídas por baterias híbridas de Ni (Hammond e Hazeldine, 2015).

As diversas atividades antropogénicas que levaram ao aparecimento de Cd encontram-se descritas na **Tabela 6.1**.

Para minimizar os riscos associados às elevadas concentrações de Cd nas partes edíveis das plantas, é recomendado que os solos que contêm mais de 1 mg Cd kg<sup>-1</sup> MS, não possam ser utilizados na produção destes produtos agrícolas (Louwagie et al., 2009).

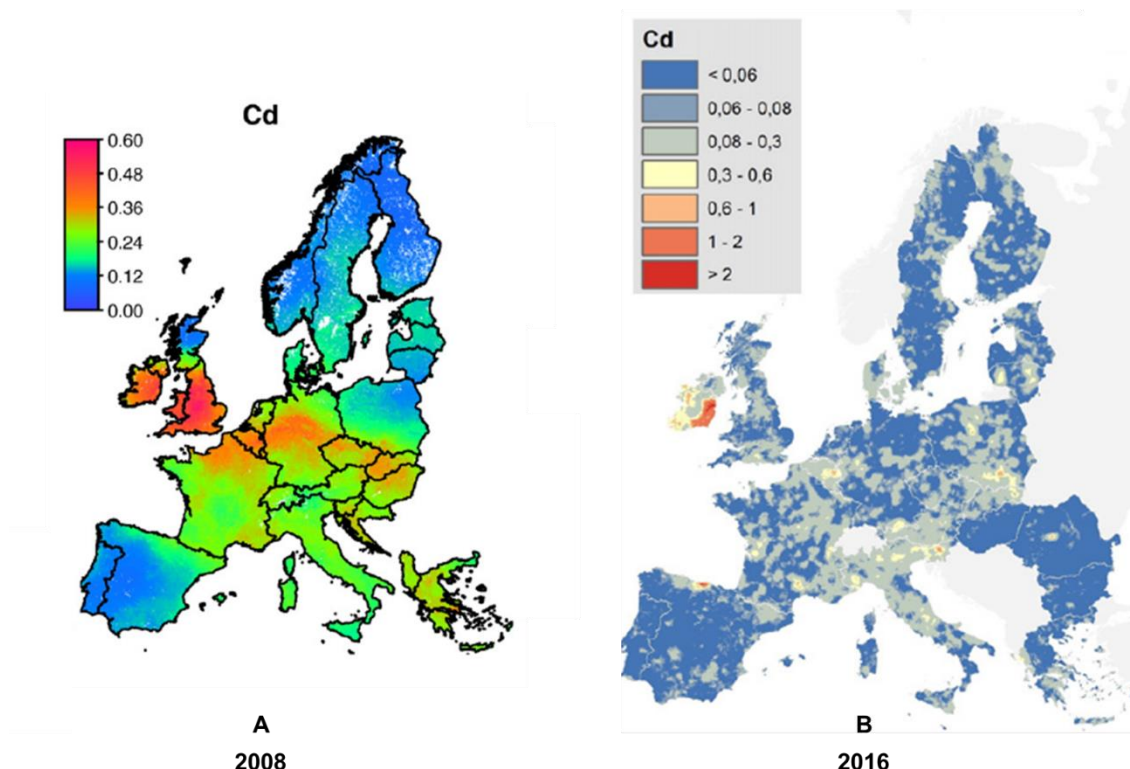
Na **Figura 6.2** encontram-se as concentrações de Cd presentes na Europa e na **Tabela 6.3** encontram-se os valores da legislação em vigor e outras *guidelines*, referentes aos teores de Cd.

#### 6.2.2.1.2. Biodisponibilidade e especiação de Cd no solo

As concentrações totais de Cd no solo não refletem necessariamente a sua disponibilidade porque a soma total de todas as formas químicas de Cd raramente está 100 % biodisponível. Para além disso, existe a presença de diferentes formas químicas (especiação química) e a distribuição de Cd é variável (adsorvido ou livre). Isto porque o comportamento geoquímico do Cd depende em grande parte da concentração de Cd livre (Dabrin et al., 2012; Duplay et al., 2014; Shahid et al., 2016a).

De modo a estimar o risco ecológico associado à contaminação por Cd no solo, é necessário então compreender a fração de Cd que está disponível para ser absorvido. O Cd é relativamente disponível para a absorção pela planta (Degryse et al., 2012), podendo ocorrer em formas catiónicas ( $\text{CdHS}^+$ ,  $\text{CdHCO}_3^+$ ,  $\text{CdCl}^+$ ) e aniónicas ( $\text{Cd}(\text{HS})_4^{2-}$ ,  $\text{Cd}(\text{OH})_3^-$ ,  $\text{Cd}(\text{OH})_4^{2-}$ ,  $\text{CdCl}_3^-$ ) (Kabata-Pendias e Sadurski, 2004).





**Figura 6.2** – Distribuição de Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) na camada superficial de solos na Europa. Fonte: adaptado de Lado et al. (2008) (A) e de Tóth et al. (2016) (B).

**Tabela 6.3** – Níveis máximos de Cd, no meio ambiente, permitidos pela legislação em vigor e outras *guidelines*.

Material	Teor de Cd	Valor/Limite	Referências Bibliográficas
Solos em que se pretende adicionar lamas de depuração	1 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} \leq 5,5$ )	LM	(Decreto-Lei n.º 276/2009)
	3 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $5,5 < \text{pH} \leq 7,0$ )	LM	
	4 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} > 7,0$ )	LM	
Solos em que se pretende aplicar matéria fertilizante	0,5 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $5,0 \leq \text{pH} < 6,0$ )	VMA	(Decreto-lei n.º103/2015)
	1 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $6,0 \leq \text{pH} < 7,0$ )	VMA	
	1,5 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} \geq 7,0$ )	VMA	
Matéria fertilizante com componentes orgânicos	0,7 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe I)	VMA	(Decreto-lei n.º103/2015)
	1,5 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe II)	VMA	
	3,0 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe IIA)	VMA	
	5,0 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe III)	VMA	
Lamas para a agricultura	20 $\text{mg kg}^{-1}$ MS	LM	(Decreto-Lei n.º 276/2009)
Água destinada ao consumo humano	5 $\mu\text{g L}^{-1}$	VMA VI	(Decreto-lei n.º236/98)* (Diretiva 98/83/CE)**
Água de rega	0,05 $\text{mg L}^{-1}$	VMA	(Decreto-lei n.º236/98)
Produtos hortícolas de folha	0,20 $\text{mg kg}^{-1}$ MF	LM	(Comission Regulation (EU) 488/2014)

\*atualizado pelo DL 83/2011, sem alteração do valor paramétrico deste poluente.

\*\* alterada pelo DL 306/2007, sem alteração do valor paramétrico deste poluente.

VMA – valor máximo admissível; VI – valor indicativo; LM – limite/teor máximo;

Classe I e II – uso agrícola; Classe IIA – uso exclusivo em arbóreas e arbustivas; Classe III – uso em culturas não destinadas a consumo humano.



Nestas condições de pH (pH ácido), a biodisponibilidade e mobilidade do Cd é maior devido à transformação de Cd de formas imóveis, tais como óxidos de Fe e Mn e carbonatos, em formas mais disponíveis e permutáveis (Li et al., 2014a). As plantas absorvem uma maior quantidade deste EPT em solos ácidos e em solos salinos devido também à formação de complexos solúveis com o íon cloreto ( $\text{CdCl}^+$ ) (Sauvé et al., 2000). Em solos básicos, existe uma maior extensão da adsorção de Cd às partículas do solo e ocorrem precipitações e, por consequência, diminui a absorção de Cd pelas plantas. Para valores de pH  $> 7,5$ , o Cd é adsorvido e precipitado (por exemplo, como  $\text{CdCO}_3$ ) e não é facilmente mobilizado (Qi et al., 2012; Sauvé et al., 2000).

A matéria orgânica do solo também desempenha um papel importante na mobilidade/biodisponibilidade do Cd, pois forma facilmente complexos com o Cd. Os solos com maior teor de m.o. apresentam uma maior capacidade em diminuir a absorção de Cd pelas plantas como resultado da adsorção de Cd e, subsequente, remoção de Cd da solução do solo (Dumat et al., 2006; Quenea et al., 2009). Diferentes materiais orgânicos quando adicionados ao solo podem ter este efeito, como a adição de estrumes, *biochar*, entre outros (Houben et al., 2013; Liu et al., 2009; Mahar et al., 2015; Shan et al., 2016).

#### 6.2.2.1.3. Avaliação de risco para a saúde

A acumulação de Cd nas plantas e a sua transferência para a cadeia alimentar constitui um risco sério para a saúde humana (Pan et al., 2010; Zhang et al., 2014a). O Cd é considerado um potencial carcinogénico humano (grupo 2B) pela EPA (*Environmental Protection Agency*), e um carcinogénico humano (grupo 1) pela IARC, e é classificado como 7º, entre as 20 substâncias perigosas pela ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) (ATSDR, 2012).

O Cd pode causar mineralização óssea, seja por lesão óssea ou por disfunção renal. Estudos realizados com seres humanos e animais revelaram que a osteoporose é uma das consequências da exposição ao cádmio, juntamente com distúrbios no metabolismo do Ca, formação de cálculos renais e hipercalcúria. A inalação de níveis mais elevados de Cd pode causar danos graves nos pulmões. Se o Cd for ingerido em quantidades mais elevadas, pode levar à irritação do estômago e originar vômitos e diarreia. Uma exposição prolongada a concentrações mais baixas pode levar à deposição lenta de Cd no rim e, originar doença renal, ossos frágeis e lesões pulmonares (Bernard, 2008). O Cd também interfere com outros nutrientes essenciais, para além do Ca, como o Zn, Fe e Cu, provocando deficiências, e



exibindo o seu efeito tóxico (Flora et al., 2008). Um resumo dos efeitos negativos do Cd na saúde humana encontra-se descritos na **Tabela 6.1**.

O surto da doença *Itai-Itai*, que ocorreu no Japão, é um dos exemplos deste efeito negativo do cádmio, causando o amolecimento dos ossos e insuficiência renal nas pessoas afetadas pelo consumo de arroz contaminado. Este surto criou uma preocupação crescente, principalmente nas populações que têm um grande consumo de arroz, como a China (Chaney, 2015; Fang et al., 2014), devido aos seus potenciais riscos para a saúde humana resultantes da contaminação de arroz com cádmio (Rizwan et al., 2016). Por estes motivos, o uso de Cd foi restringido em muitos países europeus devido ao seu elevado impacto na saúde pública (Pan et al., 2010), sendo por isso considerado um dos metais mais importantes em termos de contaminação da cadeia alimentar (Beccaloni et al., 2013; Bešter et al., 2013; Retamal-Salgado et al., 2017; Rodrigues et al., 2013).

Os fumadores são mais suscetíveis à intoxicação por cádmio. O tabaco é a principal fonte de absorção de Cd através da via atmosférica pois as plantas de tabaco, assim como outras plantas, podem acumular o cádmio proveniente do solo (Martins et al., 2011). Nos indivíduos não fumadores a exposição ao Cd ocorre geralmente através de duas fontes: por inalação e por via oral, através da ingestão de alimentos e/ou água contaminada.

A ingestão alimentar de cádmio é o fator que tem maior representatividade na exposição humana ao Cd (Yousaf et al., 2016) e é através das plantas alimentares que a maior parte deste EPT é ingerido pelos seres humanos (Tavarez et al., 2015). Estima-se que, nos EUA, a ingestão média de Cd através de alimentos contaminados (principalmente, cereais e vegetais) seja de 8 a 30  $\mu\text{g}$  de Cd  $\text{dia}^{-1}$  pessoa $^{-1}$  (Clemens et al., 2013; Järup e Akesson, 2009).

O risco de cádmio para os seres humanos ocorre no solo, em concentrações bastante inferiores às necessárias para provocar efeitos visuais nas plantas (Gonçalves et al., 2009; Rizwan et al., 2017). Estas podem apresentar um aspeto saudável, não sendo necessariamente seguras para o consumo humano. Neste sentido, a absorção e acumulação de Cd em plantas comestíveis (Akoumianakis et al., 2008; Clemens e Ma, 2016; Khan et al., 2015; Zhang et al., 2013) e seus possíveis efeitos sobre a saúde humana (Schwartz e Reis, 2000) têm recebido uma atenção considerável.

A absorção de cádmio depende também da cultura, mas os hortícolas de folha têm uma maior tendência para absorver este tipo de metal (Baldantoni et al., 2016a). Entre as plantas consumidas pelos seres humanos, os cogumelos, o arroz, a alface e outros vegetais de folhas são referidos como a principal fonte de exposição ao Cd (FAO/WHO, 2006). A presença de



cádmio em solos urbanos com a consequente contaminação dos vegetais cultivados tem sido referida por vários autores, nomeadamente em hortas urbanas (Antisari et al., 2015; McBride et al., 2014; Mombo et al., 2015; Schlecht e Säumel, 2015) e em solos localizados perto de estradas (Werkenthin et al., 2014; Zhao et al., 2015).

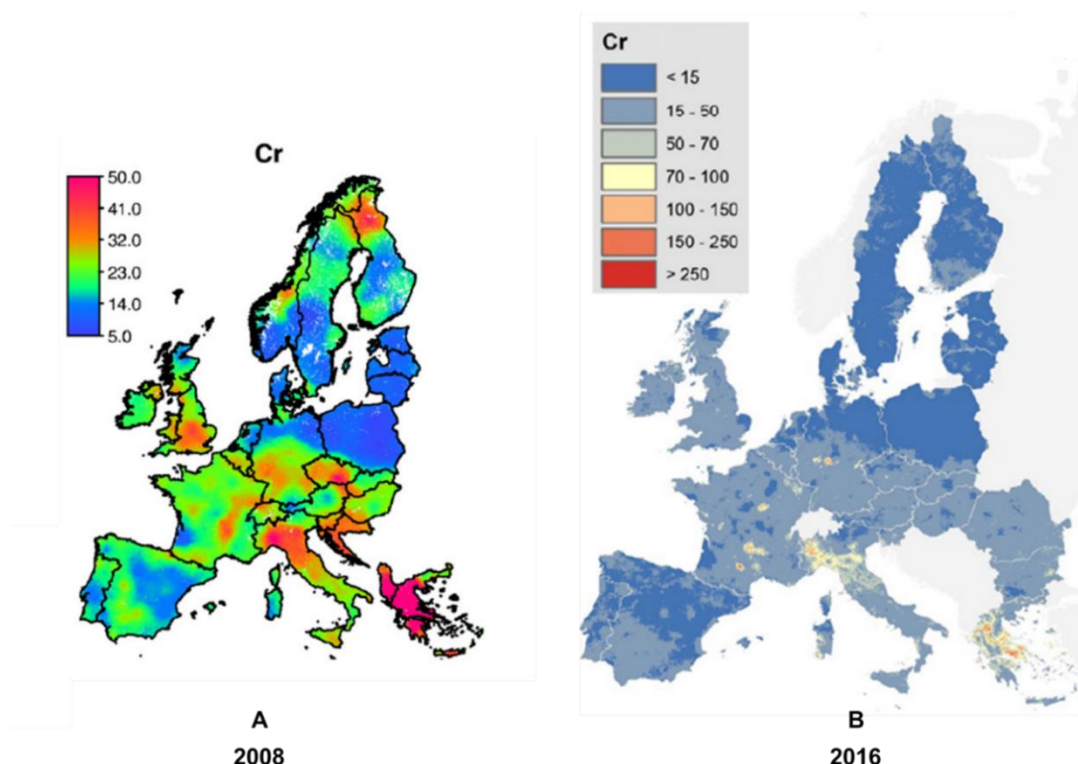
### 6.2.2.2. Crómio

#### 6.2.2.2.1. Crómio no meio ambiente

O Cr ocorre naturalmente no meio ambiente e, geralmente, existe fortemente ligado às fases primárias derivadas de rocha e óxidos de Fe (Shanker et al., 2005). Os solos derivados de rochas ultrabásicas, como serpentina, são muito ricos neste elemento (Avudainayagam et al., 2003; Babula et al., 2008; Kumar e Maiti, 2013). O Cr persiste nos minérios que lhe deram origem, podendo precipitar com os óxidos ou hidróxidos de Mn, Al ou Fe, que estão geralmente adsorvidos nas partículas do solo, ou podendo ser complexado com compostos orgânicos (Hsu et al., 2015).

O Cr é o 21º metal mais abundante da crosta terrestre e é considerado um dos 18 principais poluentes do ar (Economou-Eliopoulos et al., 2013). A contaminação do meio ambiente com Cr, nomeadamente nos solos, tem ganho uma grande relevância devido às atividades naturais e antropogénicas (**Tabela 6.1**) (Ballesteros et al., 2016; Ericson, 2011; Gil-Cardesa et al., 2014; Kotas e Stasicka, 2000; Nagajyoti et al., 2010), nomeadamente, na Grécia (Antibachi et al., 2012; Dokou et al., 2015), Inglaterra (Landrot et al., 2012), República Checa e Polónia (Novak et al., 2014), e noutros locais do mundo como a China (Cheng et al., 2014), Chile (Tume et al., 2017), México (Villalobos-Aragón et al., 2012) e EUA (Morrison et al., 2009; Yu et al., 2014). Estima-se que, globalmente, as descargas de Cr são 30, 896 e 142 ton ano<sup>-1</sup> para o ar, solo e água, respetivamente (Mohan e Pittman, 2006). Na **Figura 6.3** está representada a distribuição de Cr na camada superficial de solos na Europa.

O nível aceitável de Cr no solo para proteger o meio ambiente e a saúde humana foi estimado em 64 mg Cr kg<sup>-1</sup> (CCME, 2015). O valor máximo permitido de Cr nos solos agrícolas na Polónia, República Checa, Áustria e Canadá é de 150, 100-200, 100 e 64 mg Cr kg<sup>-1</sup>, respetivamente (Ding et al., 2014). Os limites para a concentração de Cr na água de rega e na água destinada ao consumo humano são 5 µg (Cr<sup>3+</sup>) L<sup>-1</sup> / 8 µg (Cr<sup>6+</sup>) L<sup>-1</sup> e 100 µg Cr L<sup>-1</sup>, respetivamente (Shahid et al., 2017a; Zayed e Terry, 2003). Na **Tabela 6.4** apresentam-se os níveis de Cr segundo a legislação em vigor e outras *guidelines*.



**Figura 6.3** – Distribuição de Cr ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) na camada superficial de solos na Europa. Fonte: adaptado de Lado et al. (2008) (A) e de Tóth et al. (2016) (B).

**Tabela 6.4** – Níveis máximos de Cr, no meio ambiente, permitidos pela legislação em vigor e outras guidelines.

Material	Teor de Cr	Valor/Limite	Referências Bibliográficas
Solos em que se pretende adicionar lamas de depuração	50 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} \leq 5,5$ )	LM	(Decreto-Lei n.º 276/2009)
	200 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $5,5 < \text{pH} \leq 7,0$ )	LM	
	300 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} > 7,0$ )	LM	
Solos em que se pretende aplicar matéria fertilizante	30 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $5,0 \leq \text{pH} < 6,0$ )	VMA	(Decreto-Lei, n.º 103/2015 )
	60 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $6,0 \leq \text{pH} < 7,0$ )	VMA	
	100 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} \geq 7,0$ )	VMA	
Matéria fertilizante com componentes orgânicos	100 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe I)	VMA	(Decreto-Lei, n.º 103/2015 )
	150 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe II)	VMA	
	300 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe IIA)	VMA	
	400 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe III)	VMA	
Lamas para a agricultura	1000 $\text{mg kg}^{-1}$ MS	LM	(Decreto-Lei n.º 276/2009)
Água destinada ao consumo humano	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	VMA VI	(Decreto-Lei, n.º 236/98 )* (Diretiva, 98/83/CE)**
Água de rega	20 $\text{mg L}^{-1}$	VMA	(Decreto-Lei n.º 276/2009)
Produtos hortícolas	0,2-1,0 $\text{mg kg}^{-1}$ MS	LM	(Nagajyoti et al., 2010)

\*atualizado pelo DL 83/2011, sem alteração do valor paramétrico deste poluente.

\*\* alterada pelo DL 306/2007, sem alteração do valor paramétrico deste poluente.

VMA – valor máximo admissível; VI – valor indicativo; LM – limite/teor máximo;

Classe I e II – uso agrícola; Classe IIA – uso exclusivo em arbóreas e arbustivas; Classe III – uso em culturas não destinadas a consumo humano.





#### 6.2.2.2.2. Biodisponibilidade e especiação de Cr no solo

O Cr pode ter vários estados de oxidação (+2 a +6), podendo ser facilmente convertido de um estado de oxidação para outro. As formas mais comuns e estáveis são as espécies trivalente ( $\text{Cr}^{3+}$ ) e hexavalente ( $\text{Cr}^{6+}$ ) que apresentam diferentes propriedades químicas.

O teor total de Cr no solo não reflete necessariamente o seu comportamento biogeoquímico uma vez que as diferentes espécies químicas influenciam o seu comportamento no solo (Choppala et al., 2016; Panda e Choudhury, 2005; Shahid et al., 2016b). O Cr adicionado ao solo proveniente de diferentes fontes naturais ou antropogênicas induz o aparecimento de reações redox que ocorrem espontaneamente e simultaneamente para produzir  $\text{Cr}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{6+}$  (Frohne et al., 2015).

O  $\text{Cr}^{6+}$  é considerado a forma mais tóxica, ocorrendo na forma de oxianião, normalmente associado ao oxigênio, em iões hidrocromato ( $\text{HCrO}_4^-$ ), dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) e cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) (Shadreck, 2013). O  $\text{Cr}^{3+}$  é menos tóxico e ocorre, principalmente, na forma de catião, sendo maioritariamente encontrado ligado à matéria orgânica no solo. Este predomina na maior parte dos solos, apresentando baixa mobilidade (Hayat et al., 2012; Shanker et al., 2005; Singh et al., 2013). Ambas as formas apresentam diferentes características químicas, epidemiológicas e toxicológicas. Por este motivo, são reguladas separadamente pela EPA, o que representa uma característica distintiva do Cr relativamente aos outros EPTs (Shahid et al., 2017a). Os estados de transição  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{4+}$  e  $\text{Cr}^{5+}$  são produtos instáveis durante os processos redox (Santos e Rodriguez, 2012).

A especiação do Cr é muito sensível ao potencial de redução, podendo este ser o fator mais determinante no seu comportamento no solo, uma vez que o Cr apresenta vários estados de oxidação no solo (Xiao et al., 2015).

No solo, o pH influencia os processos de adsorção/desorção e, por consequência, a especiação química do Cr através das reações redox (Ashraf et al., 2017; Balasoiu et al., 2001; Choppala et al., 2016; Dias-Ferreira et al., 2015). O  $\text{Cr}^{3+}$  é menos tóxico e móvel, porque apresenta baixa solubilidade em meios ácidos ( $\text{pH} < 5,5$ ). Acima desse valor, o  $\text{Cr}^{3+}$  hidrolisa-se originando a formação  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$  ou pode precipitar completamente em  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  (Shadreck, 2013).

Uma diminuição no pH do solo ( $\text{pH} < 7$ ) causa desorção do Cr, enquanto que elevados valores de pH ( $\text{pH} > 8$ ), levam à sua precipitação na matriz do solo, ou seja, à adsorção do Cr às partículas do solo. Deste modo, a desorção do Cr do solo para a solução do solo é mais



significativa em valores de pH mais baixos, uma vez que nesta gama apresenta elevada solubilidade, mobilidade e disponibilidade. Por outro lado, normalmente, o  $\text{Cr}^{6+}$  predomina em ambientes ricos em oxigénio com pH neutro ou alcalino (Ball e Izbicki, 2004; Shadreck, 2013).

A matéria orgânica também influencia a mobilidade, disponibilidade e adsorção/desorção do Cr no solo (Banks et al., 2006; Zeng et al., 2011). A m.o. atua naturalmente como um transportador de Cr no solo, funcionando como uma armazenagem de elementos metálicos (Quenea et al., 2009) e pode influenciar o comportamento biogeoquímico do solo devido ao seu potencial para reduzir o  $\text{Cr}^{6+}$  a  $\text{Cr}^{3+}$ . O aumento da adsorção do  $\text{Cr}^{3+}$  pela m.o. é atribuído ao aumento da capacidade de troca no solo. A adição de compostos orgânicos e inorgânicos ao solo afeta a adsorção do Cr no solo, pela alteração do pH e das cargas superficiais (Bolan e Thiagarajan, 2001; Taghipour e Jalali, 2016). Os solos com elevados níveis de m.o. apresentam condições redutoras e nestas condições a forma  $\text{Cr}^{6+}$  é convertida na forma menos tóxica  $\text{Cr}^{3+}$ , ocorrendo depois a imobilização e precipitação do  $\text{Cr}^{3+}$ . Este processo tem sido utilizado como uma etapa chave no tratamento de solos contaminados com Cr, usando vários compostos orgânicos (biomassa de plantas, algas marinhas, estrume de porco ou aves) comumente utilizados para a remediação dos solos (Bolan et al., 2003; Hattab et al., 2015; Kanchinadham et al., 2015).

#### 6.2.2.2.3. Avaliação de risco para a saúde

O Cr foi classificado como o 7º entre as 20 principais substâncias perigosas pela *ATSDR* (Oh et al., 2007) e como cancerígeno nº 1, de acordo com a *IARC* (*International Agency for Research on Cancer*) (Shahid et al., 2017a).

O crómio pode induzir vários distúrbios clínicos nos seres humanos (**Tabela 6.1**). Por outro lado, o Cr é um suplemento nutricional essencial para os animais e apresenta uma importante função no metabolismo da glucose (Jaishankar et al., 2014). No entanto, segundo os mesmos autores a exposição a compostos de crómio pode resultar em úlceras, sendo as úlceras do septo nasal muito comuns no caso de pessoas que trabalham com cromato. Para além disso, exposições muito elevadas ao crómio, podem resultar na inibição da enzima glutationa-redutase localizada nos eritrócitos, diminuindo a capacidade em reduzir a meta-hemoglobina na hemoglobina.

Na maior parte das plantas, o Cr é pouco translocado para a parte aérea, ficando retido nas raízes (Oliveira, 2012). No entanto, o consumo de produtos alimentares contaminados com Cr é considerado a principal via (> 90 %) da exposição humana, comparativamente à inalação





ou contacto direto dérmico (Wang et al., 2011a). Por este motivo, a absorção de crómio pelos hortícolas (ATSDR, 2013b), nomeadamente em alface (Qureshi et al., 2016), e a sua acumulação nas partes edíveis pode induzir vários riscos para a saúde dos consumidores através da contaminação da cadeia alimentar (Ahmed et al., 2016; Broadway et al., 2010; Chang et al., 2014; Cherfi e Gaci, 2014; Noli e Tsamos, 2016; Saha e Zaman, 2013; Xiong et al., 2016).

### 6.2.2.3. Chumbo

#### 6.2.2.3.1. Chumbo no meio ambiente

O Pb ocorre naturalmente em pequenas quantidades na crosta terrestre a partir de processos pedogénicos (Kabata-Pendias e Pendias, 2001). A quantidade média de chumbo na crosta terrestre é de 15 mg Pb kg<sup>-1</sup>. Os teores de chumbo nos tipos comuns de rocha, variam entre 1 mg Pb kg<sup>-1</sup> até a 30 mg Pb kg<sup>-1</sup> (Kushwaha et al., 2018). O Pb é comumente encontrado em minérios que também contêm Cu, Zn e Ag, sendo extraído como subproduto.

O chumbo é reconhecido como um produto químico de grande preocupação nos novos regulamentos europeus *REACH* (*Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals*) (Kushwaha et al., 2018). É um dos EPTs, sem função biológica conhecida e com longa vida nos sistemas biológicos, que se encontra uniformemente distribuído de forma ubíqua no solo porque foi amplamente introduzido através de diversas fontes antropogénicas (**Tabela 6.1**) (Bretzel e Calderisi, 2006; Fabietti et al., 2010; Giusti, 2011; Kachenko e Singh, 2006; Li et al., 2015b; McBride et al., 2014; Mitchell et al., 2014; Mombo et al., 2015; Monge et al., 2015; Szolnoki et al., 2013).

Um dos casos mais comuns de contaminação com chumbo resulta da adição deste composto a um aditivo da gasolina usado durante décadas nos combustíveis automóveis (Eichler et al., 2015; Fenger, 2009; Walraven et al., 2014; Wolfe et al., 2016). O Pb é muitas vezes referido como o contaminante mais comum em solo urbano (Attanayake et al., 2015; Brown et al., 2016; Werkenthin et al., 2014) e a sua concentração nestes solos urbano pode chegar até 150 mg Pb kg<sup>-1</sup>, podendo em casos extremos serem encontrados valores superiores a 1000 mg Pb kg<sup>-1</sup> (Datko-Williams et al., 2014; Minca et al., 2013). Os biossólidos são uma das principais fontes de EPTs libertados na América do Norte e na Europa, assim como os fertilizantes fosfatados (Brown et al., 2010; Gupta et al., 2014; Nagajyoti et al., 2010; Shaheen et al., 2017). Na **Figura 6.4** está representada a distribuição de Pb na Europa e na **Tabela 6.5**



encontram-se os níveis máximos de Pb permitidos no meio ambiente pela legislação em vigor, bem como algumas *guidelines*.

#### 6.2.2.3.2. Biodisponibilidade e especiação de Pb no solo

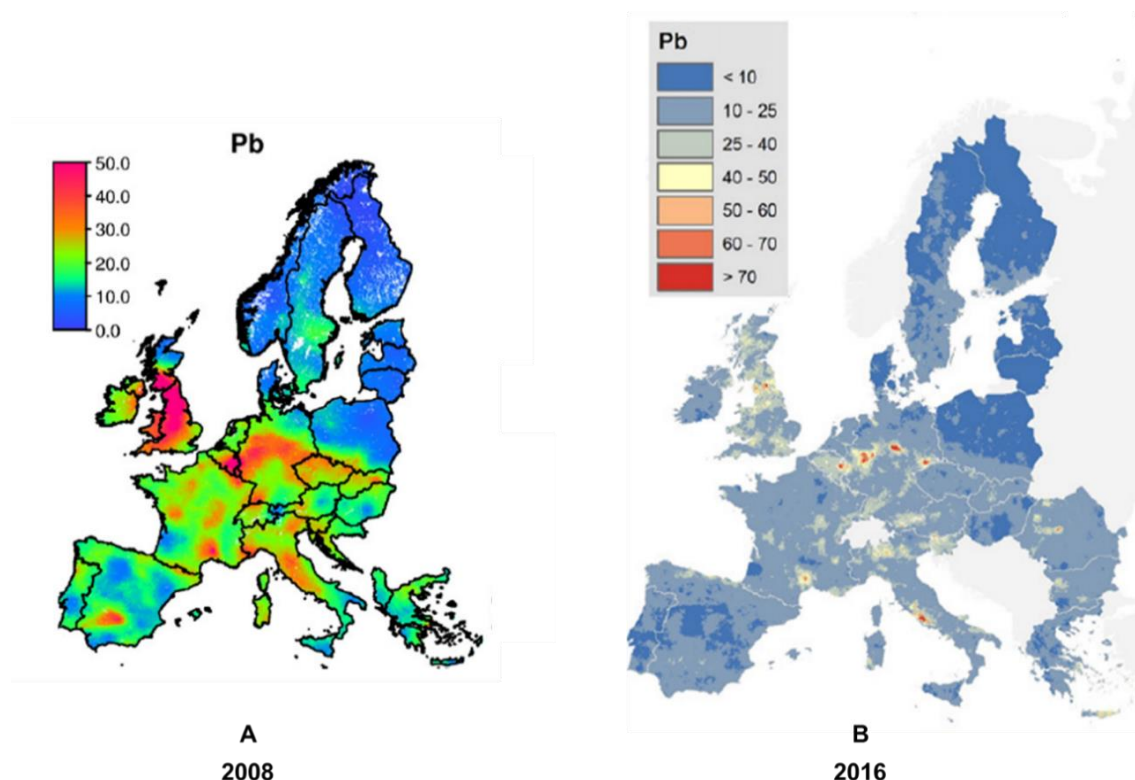
Nos solos, o Pb pode ocorrer como um íon livre ( $\text{Pb}^{2+}$ ) ou complexado com constituintes orgânicos ou inorgânicos ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{Cl}^-$ ). Alternativamente, o Pb pode ser adsorvido nas superfícies de partículas (por exemplo, óxidos de Fe, m.o. e partículas de argila) (Sammut et al., 2010; Uzu et al., 2009). As formas mais comuns de Pb que são libertadas para o solo são: íon livre ( $\text{Pb}^{2+}$ ), óxidos e hidróxidos de Pb e os complexos de oxianião de Pb (Gupta et al., 2013). Estudos recentes referiram que o Pb se encontra maioritariamente presente em solos urbanos ( $< 300$  até  $2586 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ ) na fração carbonatada complexado com a matéria orgânica ou então adsorvido a óxidos de Fe (Attanayake et al., 2014; Attanayake et al., 2015; Cheng et al., 2011).

O Pb proveniente de fontes antropogénicas (**Tabela 6.1**) acumula-se principalmente na camada superficial do solo e sua concentração diminui com a profundidade (Cecchi et al., 2008).

A migração e distribuição de Pb no solo resulta da combinação de vários fatores que incluem: reações de oxidação-redução, adsorção de catiões sobre o complexo de troca, quelação por m.o., pH do solo, tipo de solo, presença de colóides orgânicos e óxidos de Fe e a capacidade de troca catiónica (Houben et al., 2013; Kopittke et al., 2008; McBride et al., 2014; Wuana e Okieimen, 2011; Zhang et al., 2018).

O Pb tem a particularidade de se ligar fortemente com materiais orgânicos e coloidais e, por isso, é provável que apenas uma pequena quantidade de Pb esteja solúvel no solo e, deste modo, disponível para ser absorvido pelas plantas (Antonious et al., 2012; Galende et al., 2014; Kumpiene et al., 2008; Mahar et al., 2015; Tang et al., 2015; Usman et al., 2013; Yin et al., 2016; Zhu et al., 2017).

Existem diferentes respostas à adição de corretivos orgânicos a solos contaminados com chumbo porque a sua especiação e biodisponibilidade, num solo onde foi alterado o teor de matéria orgânica, depende da composição e maturidade da m.o., assim como dos locais específicos de ligação à matriz do solo (Attanayake et al., 2014; Attanayake et al., 2015).



**Figura 6.4** – Distribuição de Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) na camada superficial de solos na Europa. Fonte: adaptado de Lado et al. (2008) (A) e de Tóth et al. (2016) (B).

**Tabela 6.5** – Níveis máximos de Pb, no meio ambiente, permitidos pela legislação em vigor e outras *guidelines*.

Material	Teor de Pb	Valor/Limite	Referências Bibliográficas
Solos em que se pretende adicionar lamas de depuração	50 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} \leq 5,5$ )	LM	(Decreto-Lei n.º 276/2009)
	300 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $5,5 < \text{pH} \leq 7,0$ )	LM	
	450 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} > 7,0$ )	LM	
Solos em que se pretende aplicar matéria fertilizante	50 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $5,0 \leq \text{pH} < 6,0$ )	VMA	(Decreto-lei n.º 103/2015)
	70 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $6,0 \leq \text{pH} < 7,0$ )	VMA	
	100 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} \geq 7,0$ )	VMA	
Matéria fertilizante com componentes orgânicos	100 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe I)	VMA	(Decreto-lei n.º 103/2015)
	150 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe II)	VMA	
	300 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe IIA)	VMA	
	500 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe III)	VMA	
Lamas para a agricultura	750 $\text{mg kg}^{-1}$ MS	LM	(Decreto-Lei n.º 276/2009)
Água destinada ao consumo humano	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	VMA	(Decreto-lei n.º 236/98)*
	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	VI	(Diretiva 98/83/CE)**
Água de rega	20 $\text{mg L}^{-1}$	VMA	(Decreto-lei n.º 236/98)
Produtos hortícolas de folha	0,30 $\text{mg kg}^{-1}$ MF	LM	(Commission Regulation (EU) 1005/2015, 2015)

\*atualizado pelo DL 83/2011, sem alteração do valor paramétrico deste poluente.

\*\* alterada pelo DL 306/2007, sem alteração do valor paramétrico deste poluente.

VMA – valor máximo admissível; VI – valor indicativo; LM – limite/teor máximo;

Classe I e II – uso agrícola; Classe IIA – uso exclusivo em arbóreas e arbustivas; Classe III – uso em culturas não destinadas a consumo humano.



O pH do solo desempenha um papel crucial na persistência de Pb, uma vez que tem um efeito decisivo na retenção de chumbo, afetando significativamente a sua solubilidade e biodisponibilidade no solo. A pH alcalino, o Pb é principalmente encontrado complexado com carbonatos e fosfatos que são pouco solúveis. A pH ácido, o Pb existe como espécie iônica livre, pelo que aumenta a sua mobilidade e a biodisponibilidade, o que aumenta sua absorção pelas plantas, podendo causar efeitos tóxicos nos seres vivos (Bravo et al., 2017).

#### 6.2.2.3.3. Avaliação de risco para a saúde

De acordo com a *EPA*, o Pb é considerado um carcinógeno. O envenenamento por Pb afeta principalmente o sistema nervoso central e o trato gastrointestinal (Markowitz, 2000). A distribuição de Pb no organismo depende do fluxo sanguíneo nos vários tecidos e quase 95 % de Pb é depositado nos ossos na forma de fosfato pouco solúvel (Papanikolaou et al., 2005).

A toxicidade do Pb pode ser aguda ou crônica. A exposição aguda, ocorre principalmente em locais de trabalho e em algumas indústrias, e pode causar perda de apetite, dor de cabeça, dor abdominal, fadiga, insônia, alucinações, vertigem, e em casos mais graves, hipertensão, disfunção renal e artrite. A exposição crônica pode resultar em alergias, perda de peso, paralisia, fraqueza muscular, psicose, hiperatividade, dislexia, autismo, atraso mental, defeitos congênitos, danos cerebrais, danos renais e pode até pode causar a morte (Martin e Griswold, 2009). Os efeitos negativos do Pb na saúde humana encontram-se descritos na

#### **Tabela 6.1.**

Após a remoção de Pb da gasolina, em 1980, e das latas dos produtos alimentares, em 1990, a agência norte-americana *FDA (Food and Drug Administration)* estimou que numa dieta de uma criança de 2 anos, cerca de 16 % do Pb é proveniente da alimentação, 75 % de poeiras e 1 % do solo. Para mulheres em idade fértil, estas percentagens alteram-se para 43 % a partir da alimentação, 31 % de poeiras e uma quantidade insignificante a partir do solo (Brown et al., 2016). O chumbo presente no solo urbano, onde as crianças estão especialmente em risco de contacto, é um problema particular, pois são mais vulneráveis ao envenenamento por Pb do que os adultos. Os efeitos negativos do Pb, principalmente em crianças e adolescentes, têm sido referidos por vários autores (Balabanova et al., 2017; Deckers e Steinnes, 2004; Hanna-Attisha et al., 2016; Reis et al., 2014; Zartarian et al., 2017).

A presença de chumbo no sangue é mais elevada em crianças de áreas urbanas do que em comunidades suburbanas ou rurais (Filippelli e Laidlaw, 2010; Stewart et al., 2014). A *EPA*, *CDC (Center for Disease Control and Prevention)* e a *AAP (American Academy of Pediatrics)*



concordaram que não existe um nível seguro de chumbo no sangue de crianças, uma vez que até níveis baixos podem resultar em crescimento lento, problemas de audição, anemia, problemas de comportamento e aprendizagem, menor QI e hiperatividade (Centers for Disease Control and Prevention, 2017; Council on Environmental Health, 2016; Taylor et al., 2012; United States Environmental Protection Agency, 2017).

O envenenamento por chumbo tem sido referido em numerosos países, como no Senegal (Haefliger et al., 2009), Quênia (Ondayo et al., 2016) e na Nigéria (Lo et al., 2012) em aldeias que participaram na reciclagem de baterias contendo chumbo e no processamento do minério de ouro. Tais estudos demonstraram os desafios que muitos países em desenvolvimento ainda enfrentam em relação à contaminação com Pb e o seu efeito na saúde humana (Wu et al., 2015).

Ao contrário do Cd, o Pb é pouco translocado para a parte aérea das plantas, pelo que a intoxicação por este elemento pela via alimentar não é muito frequente, a não ser que se consumam alimentos mal lavados que contenham à sua superfície poeiras contaminadas. Apesar disto, existe uma preocupação com o risco potencial para a saúde humana em se cultivar hortícolas em solos urbanos, sendo esta via de exposição muitas vezes considerada uma preocupação, tal como observado num estudo realizado com alface por Waterlot et al. (2013). Jean-Soro et al. (2015) verificaram que os teores de Pb, presentes em produtos hortícolas numa horta urbana em Nantes, foram superiores ao valor máximo autorizado em vegetais. Antoniadis et al. (2017) observaram que o Pb contribuiu em 77 % para o risco total para a saúde humana atribuído à ingestão direta do solo e de vegetais. Outros autores também observaram teores de Pb em hortícolas colhidos em locais urbanos (Attanayake et al., 2015; Defoe et al., 2014; Intawongse e Dean, 2006; Sipter et al., 2008), nomeadamente em hortas urbanas (Attanayake et al., 2014; McBride et al., 2014) e em locais perto de estradas (Amato-Lourenco et al., 2016; Säumel et al., 2012; Werkenthin et al., 2014).

Uma das formas de prevenir a contaminação com chumbo é seleccionar o tipo de cultura adequada, de modo a minimizar a transferência de Pb no sistema solo-planta-humano. Outras medidas preventivas para minimizar o risco de ingestão direta de solos contaminados, passam pela lavagem dos produtos hortícolas antes do consumo para remover as partículas aderentes do solo (Brown et al., 2016).



#### 6.2.2.4. Níquel

##### 6.2.2.4.1. Níquel no meio ambiente

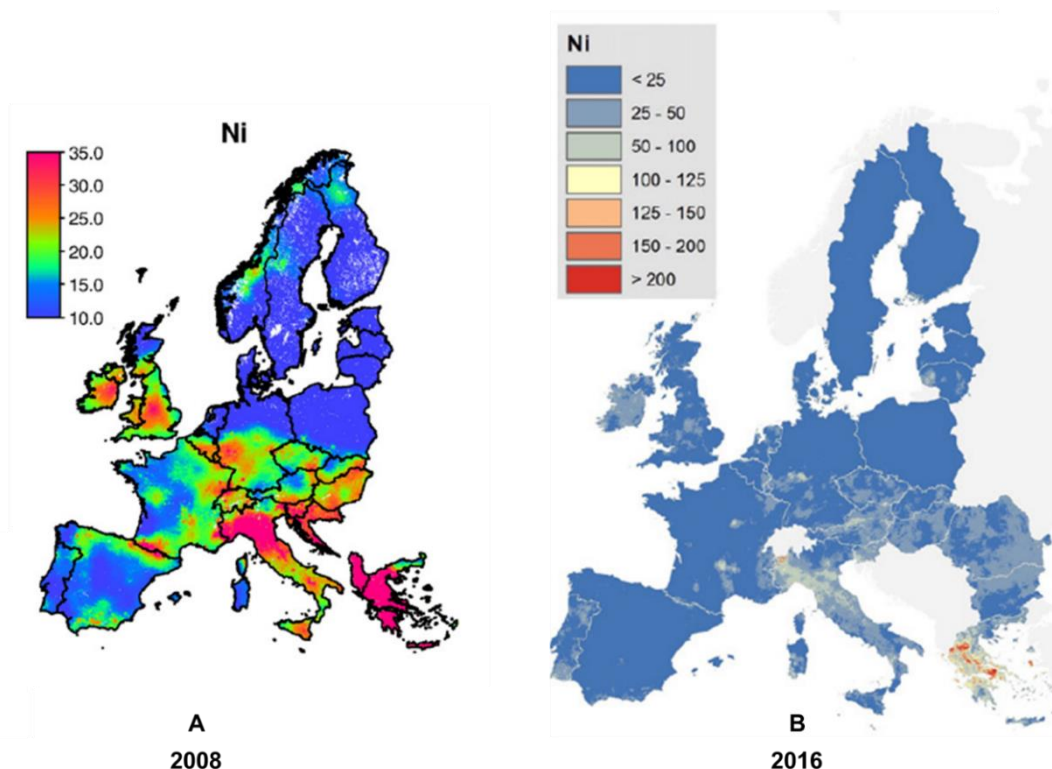
O Ni é considerado o 24º metal mais abundante e constitui aproximadamente 0,08 % da crosta terrestre, estando amplamente distribuído no solo (Ishtiaq e Mahmood, 2011). O Ni apresenta estados de oxidação que variam entre -1 a +4, sendo a forma divalente ( $\text{Ni}^{2+}$ ) mais estável no ambiente e nos sistemas biológicos, numa ampla gama de pH. É considerado um nutriente essencial para as plantas, em pequenas quantidades, e a sua fitotoxicidade é considerada mais importante que a sua escassez (Chen et al., 2009; Poonkothai e Vijayavathi, 2012).

Os minérios de Ni mais significativos são a garnierite, pentlandite (sulfureto de Fe-Ni), assim como o silicato de Mg-Ni. Encontra-se presente em menor quantidade em rochas sedimentares enquanto as maiores concentrações existem em rochas ígneas ultrabásicas (Iyaka, 2011). Existe uma mancha destes solos, derivados de serpentina, no distrito de Bragança, entre Macedo de Cavaleiros e Miranda do Douro (Varennnes, 2003). A sua toxicidade surge nestes solos derivados de serpentina, onde a maior parte das plantas não consegue sobreviver (Hseu e Lai, 2017; Kumar e Maiti, 2013). Nos restantes solos, principalmente na sua superfície, o seu teor é um reflexo dos processos de pedogénese e da atividade do Homem.

O teor de Ni ocorre naturalmente em concentrações de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  no solo e  $0,005 \text{ mg L}^{-1}$  na água (Bermudez et al., 2012; Chen et al., 2009). Os teores normais de Ni nas plantas são da ordem dos  $1\text{-}10 \text{ mg Ni kg}^{-1} \text{ MS}$ , embora as plantas que crescem em solos derivados de serpentina, naturalmente ricos no elemento, consigam acumular níveis mais elevados (Seregin e Kozhevnikova, 2006; Varennnes, 2003). Na **Tabela 6.6** encontram-se os níveis máximos de Ni permitidos pela legislação em vigor e algumas *guidelines*.

Nos últimos anos, a rápida industrialização e as atividades antropogénicas (**Tabela 6.1**) causaram um aumento da concentração de Ni presente no meio ambiente (Alloway, 2013; Nagajyoti et al., 2010; Rasmussen et al., 2013; Rodríguez-Seijo et al., 2016 ; Romic e Romic, 2003; Sreekanth et al., 2013; Tian et al., 2012; Yusuf et al., 2012). A presença de Ni tem sido referida em vários locais, nomeadamente na Ásia (Ahmad et al., 2007; van der Ent et al., 2015; Zarcinas et al., 2004), Europa (Albanese et al., 2015; Bini et al., 2017; Di Giuseppe et al., 2017; Kozlow, 2005; Papadopoulos et al., 2007) e América do Norte (Kukier et al., 2004; Yusuf et al., 2011). Na **Figura 6.5** está representada a sua distribuição na Europa.





**Figura 6.5** – Distribuição de Ni ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) na camada superficial de solos na Europa. Fonte: adaptado de Lado et al. (2008) (A) e de Tóth et al. (2016) (B).

**Tabela 6.6** – Níveis máximos de Ni, no meio ambiente, permitidos pela legislação em vigor e outras *guidelines*.

Material	Teor de Ni	Valor/Limite	Referências Bibliográficas
Solos em que se pretende adicionar lamas de depuração	30 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} \leq 5,5$ )	LM	(Decreto-Lei n.º 276/2009)
	75 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $5,5 < \text{pH} \leq 7,0$ )	LM	
	110 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} > 7,0$ )	LM	
Solos em que se pretende aplicar matéria fertilizante	15 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $5,0 \leq \text{pH} < 6,0$ )	VMA	(Decreto-lei n.º103/2015)
	50 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $6,0 \leq \text{pH} < 7,0$ )	VMA	
	70 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} \geq 7,0$ )	VMA	
Matéria fertilizante com componentes orgânicos	50 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe I)	VMA	(Decreto-lei n.º103/2015)
	100 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe II)	VMA	
	200 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe IIA)	VMA	
	200 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe III)	VMA	
Lamas para a agricultura	300 $\text{mg kg}^{-1}$ MS	LM	(Decreto-Lei n.º 276/2009)
Água destinada ao consumo humano	-	VMA	(Decreto-lei n.º236/98)*
	20 $\mu\text{g L}^{-1}$	VI	(Diretiva 98/83/CE)**
Água de rega	2,0 $\text{mg L}^{-1}$	VMA	(Decreto-lei n.º236/98)
Produtos hortícolas	1,0 $\text{mg kg}^{-1}$ MS	LM	(Nagajyoti et al., 2010) (Varennnes, 2003)
	1-10 $\text{mg kg}^{-1}$ MS		

\*atualizado pelo DL 83/2011, sem alteração do valor paramétrico deste poluente.

\*\* alterada pelo DL 306/2007, sem alteração do valor paramétrico deste poluente.

VMA – valor máximo admissível; VI – valor indicativo; LM – limite/teor máximo;

Classe I e II – uso agrícola; Classe IIA – uso exclusivo em arbóreas e arbustivas; Classe III – uso em culturas não destinadas a consumo humano.





#### 6.2.2.4.2. Biodisponibilidade e especiação de Ni no solo

O Ni está presente no solo nas formas iônicas ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{NiOH}^+$ ) e também quelatado a moléculas orgânicas. Para além disso, este elemento é adsorvido quimicamente a compostos de Fe, Al ou Mn (sobretudo óxidos) e a carbonatos.

Em valores de pH baixo, o Ni existe na forma de  $\text{Ni}^{2+}$ . Em pH neutro até soluções ligeiramente alcalinas, o Ni precipita como  $\text{Ni}(\text{OH})_2$ , que é um composto estável. Este precipitado pode rapidamente dissolver-se em soluções ácidas originando  $\text{Ni}^{3+}$  e em condições muito alcalinas, originar a formação de  $\text{H}\text{NiO}_2$ , que é solúvel em água. Em condições oxidantes e alcalinas, o Ni existe na forma estável de óxido:  $\text{Ni}_3\text{O}_4$ . Outros óxidos de Ni, como o  $\text{Ni}_2\text{O}_3$  e  $\text{NiO}_2$  são instáveis em soluções alcalinas e decompõe-se pela libertação de  $\text{O}_2$ . Em regiões ácidas, estes sólidos dissolvem-se originando  $\text{Ni}^{2+}$  (Wuana e Okieimen, 2011). Por este motivo, a disponibilidade de Ni diminui com o aumento do pH na solução do solo devido à formação de complexos pouco solúveis.

O Ni pode tornar-se um problema resultante da diminuição do pH do solo, devido à utilização reduzida de calagem em solo agrícolas e ao aumento da chuva ácida em áreas industrializadas (Cempel e Nickel, 2006). Com a diminuição do pH, a solubilidade e a mobilidade do Ni aumentam, sendo o pH do solo um dos principais fatores que controla a adsorção/desorção de Ni. Alguns estudos também têm sido realizados com o intuito de diminuir a disponibilidade e absorção de Ni em solos contaminados onde se adicionaram materiais que podem funcionar como adsorventes ou agentes de imobilização “*in situ*” (Aziz et al., 2017; Méndez et al., 2014; Puga et al., 2015).

#### 6.2.2.4.3. Avaliação de risco para a saúde

O Ni é um elemento que apenas é necessário em pequenas doses para a função de determinados organismos. A exposição dos seres humanos pode ser feita pelo ar, água ou produtos alimentares (Cempel e Nickel, 2006; Tóth et al., 2016).

Uma vez que o Ni está sempre presente no ambiente, a exposição a baixas concentrações não pode ser evitada e, provavelmente, não é prejudicial para o Homem.

No entanto, a exposição em locais com elevada contaminação com Ni tem o potencial para produzir uma série de efeitos patológicos nos seres humanos, nomeadamente através da dermatite de contacto ou originando fibrose pulmonar, doenças cardiovasculares e renais, ou até cancro (Chen et al., 2017; Denkhaus e Salnikow, 2002; Kasprzak et al., 2003). Os



problemas na saúde surgem devido à exposição a elevadas doses de Ni presentes em locais próximos de áreas industrializadas onde se faça o processamento de Ni (Li et al., 2014b; Lu et al., 2015; Yeganeh et al., 2013b). A sua presença pode causar vários tipos de efeitos negativos descritos na **Tabela 6.1**.

Vários estudos foram realizados onde se detetou a presença de Ni em zonas urbanas (Chen et al., 2015), nomeadamente em hortas urbanas (Warming et al., 2015) e em produtos hortícolas, como a alface (França et al., 2017).

#### 6.2.2.5. Zinco

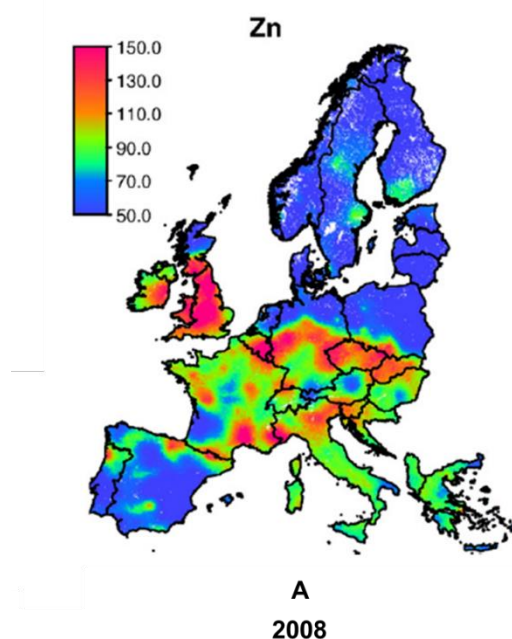
##### 6.2.2.5.1. Zinco no meio ambiente

A maior parte dos solos contêm entre 50 a 300 mg Zn kg<sup>-1</sup> de solo. Contudo, mais de 90 % do Zn encontra-se na estrutura de minerais primários e secundários. O restante Zn presente no solo está adsorvido quimicamente aos colóides minerais do solo, no complexo de troca, quelatado pela m.o. ou em solução (Varennnes, 2003).

Os níveis mais elevados de Zn ocorrem em solos perto de minas ou devido à aplicação de compostos orgânicos muito ricos neste elemento ao solo (**Tabela 6.1**). Vários autores referiram a presença de Zn em áreas próximas de minas na China (Li et al., 2014b), Tunísia (Boussen et al., 2013), EUA (Beyer et al., 2013) e França (Douay et al., 2007; Waterlot et al., 2013), em hortas urbanas na Alemanha (Antoniadis et al., 2017) e na Nigéria (Abdu et al., 2011), em solos urbanos no Porto (Fernández-Genito e Duarte, 2015; Rodrigues et al., 2013), em estradas em Dublin (Dao et al., 2014) e em vários locais na Europa (Werkenthin et al., 2014). Na **Figura 6.6** encontra-se a distribuição de Zn na Europa e na **Tabela 6.7** encontram-se algumas *guidelines* e os níveis máximos de Zn permitidos pela legislação em vigor.

##### 6.2.2.5.2. Biodisponibilidade e especiação de Zn no solo

O Zn é um dos elementos mais móveis no solo (Reichman, 2002; Sagardoy et al., 2009). O Zn é absorvido e translocado pelas plantas na forma iónica (Zn<sup>2+</sup>), sendo esta forma divalente a mais encontrada no solo (Broadley et al., 2007), ou na forma ZnOH<sup>+</sup>, complexado organicamente em solução ou facilmente adsorvido na superfície de colóides (Oliver e Gregory, 2015).



**Figura 6.6** – Distribuição de Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) na camada superficial de solos na Europa. Fonte: adaptado de Lado et al. (2008) (A).

**Tabela 6.7** – Níveis máximos de Zn, no meio ambiente, permitidos pela legislação em vigor e algumas *guidelines*.

Material	Teor de Zn	Valor/Limite	Referências Bibliográficas
Solos em que se pretende adicionar lamas de depuração	150 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} \leq 5,5$ )	LM	(Decreto-Lei n.º 276/2009)
	300 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $5,5 < \text{pH} \leq 7,0$ )	LM	
	450 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} > 7,0$ )	LM	
Solos em que se pretende aplicar matéria fertilizante	60 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $5,0 \leq \text{pH} < 6,0$ )	VMA	(Decreto-lei n.º103/2015)
	150 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $6,0 \leq \text{pH} < 7,0$ )	VMA	
	200 $\text{mg kg}^{-1}$ MS ( $\text{pH} \geq 7,0$ )	VMA	
Matéria fertilizante com componentes orgânicos	200 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe I)	VMA	(Decreto-lei n.º103/2015)
	500 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe II)	VMA	
	1000 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe IIA)	VMA	
	1500 $\text{mg kg}^{-1}$ MS (Classe III)	VMA	
Lamas para a agricultura	2500 $\text{mg kg}^{-1}$ MS	LM	(Decreto-Lei n.º 276/2009)
Água destinada ao consumo humano	3,0-5,0 $\text{mg L}^{-1}$	VMA	(Decreto-lei n.º236/98)*
	-	VI	(Diretiva 98/83/CE)**
Água de rega	10 $\text{mg L}^{-1}$	VMA	(Decreto-lei n.º236/98)
Produtos hortícolas	15-200 $\text{mg kg}^{-1}$ MS	LM	(Nagajyoti et al., 2010)

\*atualizado pelo DL 83/2011, sem alteração do valor paramétrico deste poluente.

\*\* alterada pelo DL 306/2007, sem alteração do valor paramétrico deste poluente.

VMA – valor máximo admissível; VI – valor indicativo; LM – limite/teor máximo;

Classe I e II – uso agrícola; Classe IIA – uso exclusivo em arbóreas e arbustivas; Classe III – uso em culturas não destinadas a consumo humano.



A contaminação dos solos com zinco é geralmente determinada com base no teor total de Zn no solo. A fração pseudototal de Zn dá uma informação do potencial de contaminação, e não da toxicidade real (Stanislawska-Glubiak e Korzeniowska, 2005). A biodisponibilidade de Zn depende de vários fatores, tais como: reação, textura, teor de m.o., teor de carbonatos, teor de óxidos e hidróxidos de Fe, Al e Mn, teor de fosfato e potencial redox (Aref, 2011; Bucher e Schenk, 2000). O teor de zinco na solução do solo é muito baixo e, parte do Zn em solução, está quelatado a pequenas moléculas orgânicas, como ácidos orgânicos e aminoácidos (Varennnes, 2003).

A solubilidade do zinco é normalmente baixa e depende do pH. O Zn pode estar fixo em argilas e a sua adsorção nos colóides do solo aumenta quando o pH também aumenta, resultando numa baixa disponibilidade (Alloway, 2009). Em solos ácidos, encontra-se sobretudo na forma iônica livre ( $\text{Zn}^{2+}$ ). A pH mais elevado surgem outros iões como  $\text{Zn}(\text{OH})^+$ ,  $\text{Zn}(\text{HCO}_3)^+$  e  $\text{Zn}(\text{CO})_3$ . A presença de óxidos e hidróxidos de Fe, Al e Mn diminui a quantidade de Zn à disposição das plantas. Segundo Alloway (2008) a  $\text{pH} < 7,7$  predomina a forma  $\text{Zn}^{2+}$ , a  $7,7 < \text{pH} < 9,11$  a espécie em maior quantidade é  $\text{Zn}(\text{OH})^+$ , e para valores de  $\text{pH} > 9,11$ , domina a forma hidróxido,  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ .

A matriz do solo apresenta locais de adsorção com carga negativa que se ligam ao Zn, o que diminui a sua biodisponibilidade, por retirar o elemento da solução. Vários estudos têm sido realizados com o intuito de diminuir a disponibilidade e absorção de Zn (Elouear et al., 2016; Maxted et al., 2007; Puga et al., 2015).

#### 6.2.2.5.3. Avaliação de risco para a saúde

Em comparação com outros elementos potencialmente tóxicos, o Zn é considerado um elemento relativamente não-tóxico para os humanos, sendo um dos principais elementos essenciais considerados como promotores metabólicos (Graham et al., 2012). Apenas uma exposição a elevadas doses pode ter efeitos tóxicos, ou seja, uma intoxicação aguda com Zn é rara. Por outro lado, a suplementação com elevadas doses de Zn interfere com a absorção de Cu. Deste modo, muitos dos seus efeitos tóxicos devem-se à deficiência em Cu (Plum et al., 2010).

Existem três vias de entrada de zinco: por ingestão, inalação ou através da pele (ATSDR, 2005). Devido à sua natureza como um elemento essencial, a absorção oral de pequenas quantidades de Zn é essencial para a sobrevivência dos seres vivos. A ingestão recomendada é de 11 mg Zn  $\text{dia}^{-1}$  para os homens e 8 mg Zn  $\text{dia}^{-1}$  para as mulheres. Nos bebés (2–3 mg



Zn dia<sup>-1</sup>) e crianças (5–9 mg Zn dia<sup>-1</sup>) é recomendada a ingestão de uma dose menor (Trumbo et al., 2001). Estes valores são significativamente menores ao valor de LD<sub>50</sub>, que foi estimado em 27 g Zn dia<sup>-1</sup> (ATSDR, 2005). Os sintomas imediatos após a absorção de quantidades tóxicas de Zn incluem dor abdominal, náuseas e vômitos. Os efeitos adicionais incluem letargia, anemia e tonturas (Plum et al., 2010). Na **Tabela 6.1** encontram-se os principais efeitos negativos causados pelo Zn.

A espécie de planta também é importante no estudo da fitotoxicidade do Zn. As culturas, menos resistentes à presença de Zn são os cereais. Por outro lado, a alfafa, ervilhas, alface e espinafre são consideradas moderadamente sensíveis, e os mais resistentes são as batatas, feijões e trevo (Baran, 2013; Broadley et al., 2007; Stanislawska-Glubiak e Korzeniowska, 2005). Estudos recentes identificaram a presença de Zn em locais urbanos (Qureshi et al., 2016; Waterlot et al., 2013) e em hortas urbanas (Antoniadis et al., 2017), com potencialidade para contaminar produtos alimentares (Pinto e Ramos, 2008).

### 6.3. Materiais e métodos

#### 6.3.1 Material Vegetal

Estes ensaios foram realizados utilizando a alface M4E de folha avermelhada (2.1.1.) com a justificação referida em 5.3.1.

#### 6.3.2. Delineamento experimental

No delineamento experimental definiu-se o tempo prévio de contaminação de solos, as concentrações de EPTs a aplicar, o teor de água a adicionar e a adubação utilizada, a quantidade de corretivos orgânicos e a metodologia aplicada para a instalação dos ensaios.

A metodologia utilizada nestes ensaios baseou-se, principalmente, nos resultados obtidos no ensaio prévio e em ensaios descritos por outros autores (Chen et al., 2008; Chubar et al., 2003; Luo et al., 2015; Mota et al., 2006; Sikka e Nayyar, 2012).

Os ensaios de cultura com solo foram preparados em 3 etapas. Numa 1<sup>a</sup> etapa houve a contaminação prévia dos solos para ocorrer a incubação do EPT. Após este período de incubação, numa 2<sup>a</sup> etapa, adicionaram-se os corretivos e a adubação ao solo, e na 3<sup>a</sup> etapa ocorreu a transplantação das plantas para o solo.



Antes de se iniciar os ensaios foi feita uma caracterização completa do solo, como indicado na **Tabela 6.8**. Esta análise também permitiu verificar quais as concentrações de EPT a aplicar em função do pH do solo.

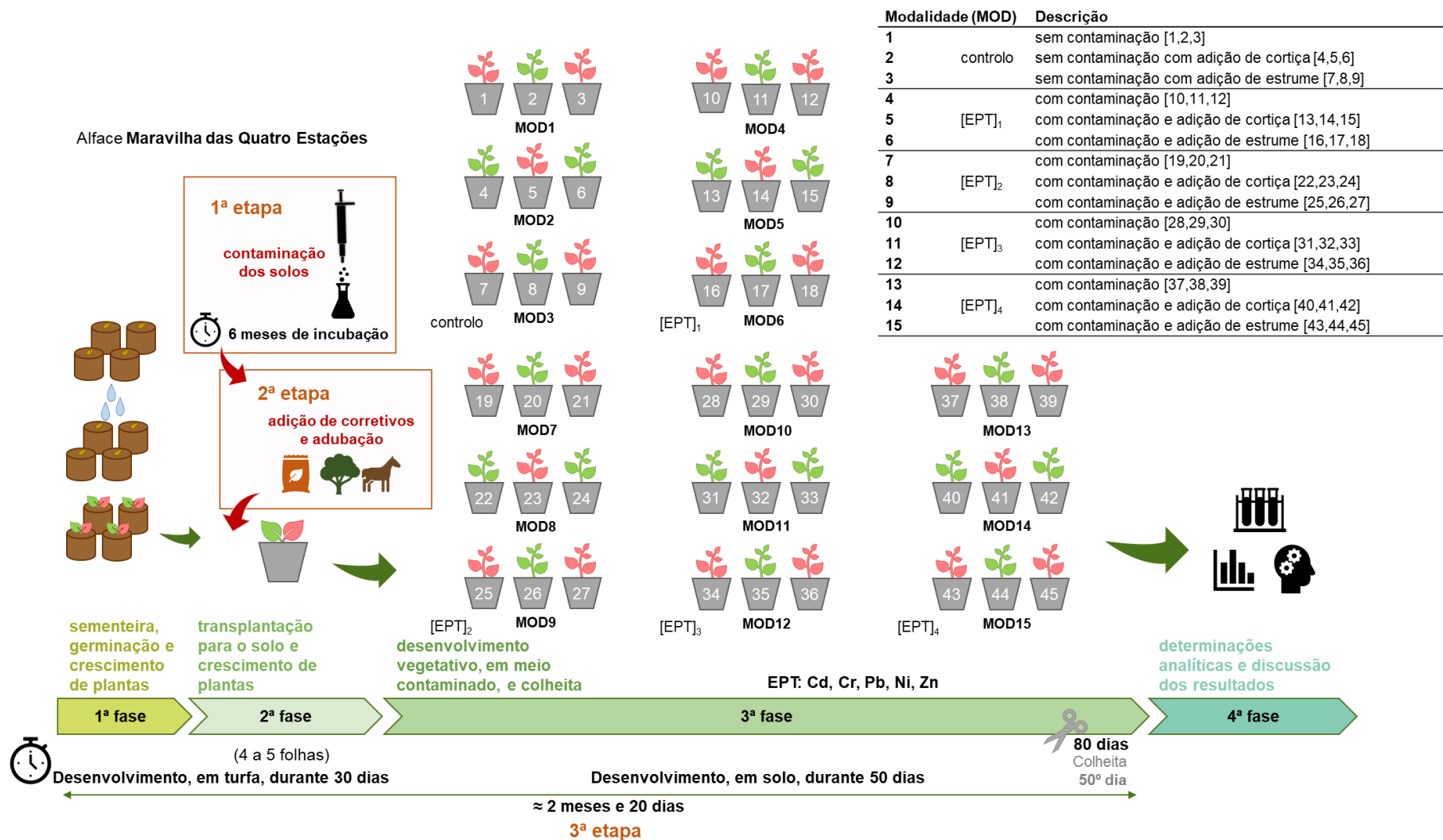
**Tabela 6.8** – Caracterização inicial do solo, da zona do Almotivo, na Tapada da Ajuda.

Parâmetro	Solo	Parâmetro	Solo
Textura de campo	Arenosa (grosseira)	Ferro extraível (Fe)	31,1 (médio)
Condutividade (1:2) (mS cm <sup>-1</sup> )	0,1 (não salino)	Cobre extraível (Cu)	4,8 (médio)
pH (H <sub>2</sub> O) (1:2,5)	6,9 (neutro)	Zinco extraível (Zn)	1,4 (baixo)
Matéria orgânica g kg <sup>-1</sup>	1,36 (baixo)	Manganês extraível (Mn)	35,2 (médio)
Fósforo extraível (P) (mg kg <sup>-1</sup> )	73,8 (alto)	Magnésio (Mg)	17,1 (muito alto)
Potássio extraível (K) (mg kg <sup>-1</sup> )	57,5 (médio)	Sódio (Na)	0,2 (baixo)
Azoto amoniacal (N-NH <sub>4</sub> ) (mg kg <sup>-1</sup> )	2,35	Potássio (K)	0,2 (baixo)
Azoto nítrico (N-NO <sub>3</sub> ) (mg kg <sup>-1</sup> )	< 1,0	Cálcio (Ca)	42,7 (muito alto)
Cálcio extraível (Ca) (mg kg <sup>-1</sup> )	8,6 (muito alto)	Relação Ca troca / Mg troca	2,5 (desfavorável, predomínio do Mg sobre o Ca)
Magnésio extraível (Mg) (mg kg <sup>-1</sup> )	2,1 (muito alto)	Relação K troca / Mg troca	0,0 (predomínio do Mg sobre o K)

Num ensaio utilizaram-se 45 vasos, distribuídos por 15 modalidades, com 3 repetições (amostra controlo e amostras contaminadas [EPT<sub>1</sub>], [EPT<sub>2</sub>], [EPT<sub>3</sub>] e [EPT<sub>4</sub>]), tal como exemplificado na **Figura 6.7**. Cada vaso continha 4 kg de solo proveniente da zona do Almotivo da Tapada da Ajuda.

Numa 1<sup>a</sup> etapa os solos foram incubados sem cultura, durante 6 meses para se obter uma estabilização das formas minerais adicionadas (Cao et al., 2004; Sikka e Nayyar, 2012; Singh et al., 2007).

O teor de água adicionado foi o adequado para se obter cerca de 60 % da saturação do solo para a água. Este valor foi mantido durante o ensaio por diferença de peso. Ao longo dos 6 meses de incubação também foi necessário manter os solos hidratados, mas sem exceder 60 % da capacidade máxima de retenção do solo para evitar a sua lixiviação.



**Figura 6.7** – Representação esquemática dos ensaios de avaliação do efeito da adição de corretivos orgânicos em solo.





Os solos foram contaminados artificialmente, com as concentrações crescentes definidas para cada EPT. As concentrações foram escolhidas tendo por base o Decreto-Lei n.º 276 (Decreto-lei, n.º 276/2009), que define os valores limite de concentração de metais pesados nos solos, em função do seu pH, aos quais se pretende adicionar lamas de depuração. Deste modo, como o solo da Tapada apresentou um pH neutro, definiram-se as concentrações para este estudo indicadas na **Tabela 6.9**.

**Tabela 6.9** – Concentrações de EPT aplicadas nos ensaios de avaliação do efeito da adição de corretivos orgânicos em solo.

EPT	Controlo	[EPT] <sub>1</sub>	[EPT] <sub>2</sub>	[EPT] <sub>3</sub>	[EPT] <sub>4</sub>
(mg kg <sup>-1</sup> )					
<b>não essenciais</b>					
Cd	0	1,5	3	6	12
Cr	0	100	200	400	800
Pb	0	150	300	600	1200
<b>essenciais</b>					
Ni	0	37,5	75	150	300
Zn	0	150	300	600	1200

As concentrações foram definidas tendo por base o valor referência ([EPT]<sub>2</sub>) que corresponde ao valor limite de concentração de metais pesados nos solos neutros ( $5,5 < \text{pH} \leq 7,0$ ) (mg kg<sup>-1</sup> de MS). O valor de [EPT]<sub>1</sub> corresponde a metade da concentração do valor referência, sendo a única concentração inferior a este limite. O valor de [EPT]<sub>3</sub> e [EPT]<sub>4</sub> representam o dobro e o quadruplo do valor referência, respetivamente, para se verificar se existe efeito adverso resultante da presença do EPT.

A preparação das soluções de contaminação, em água desionizada, foi realizada a partir de cada um dos sais descritos em 2.1.2., para se obter a concentração pretendida para cada modalidade. A única exceção foi a amostra controlo, a qual só foi incubada com água desionizada, em vez de solução de contaminação.

Numa 2ª etapa, a adubação utilizada é a que normalmente se realiza em ensaios neste tipo de vasos para esta cultura tendo em atenção a análise de solo prévia. O azoto (N) foi aplicado na proporção de 0,15 g N kg<sup>-1</sup> de solo, na forma de nitrato de amónio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), sendo aplicado  $\frac{1}{3}$  em fundo e  $\frac{2}{3}$  em duas coberturas, ou seja, 3 e 6 semanas após as plantas serem



transplantadas para o solo. O fósforo (P) e o potássio (K) foram aplicados antes da plantação na proporção de 0,033 g P kg<sup>-1</sup> de solo e 0,125 g K kg<sup>-1</sup> de solo, na forma de hidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e sulfato de potássio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Os corretivos orgânicos, pó de cortiça e estrume de cavalo, foram cedidos pela empresa *ROBCORK* e pela Sociedade Hípica Portuguesa, respetivamente. Os corretivos adicionados são materiais ricos em matéria orgânica, e por isso, inicialmente começou por se calcular o seu teor de matéria orgânica (**2.4.2.**), obtendo-se 74 % de m.o para o estrume seco (43 g C) e 80 % m.o. para a cortiça (46,9 g C). Para se calcular a quantidade a aplicar ao solo, partiu-se da proporção que se aplica no campo de 20 ton de estrume húmido por hectare, correspondendo a 24 g de estrume seco por 4 kg de solo (39 % de humidade), e calculou-se o teor de carbono orgânico total presente. Para a cortiça calculou-se a quantidade de cortiça necessária para se obter um teor de carbono orgânico total equivalente ao estrume. Estes valores corresponderam a 1 % do solo colocado no vaso (4 kg). A quantidade de corretivo orgânico a aplicar foi definida, tendo por base os resultados obtidos no ensaio prévio, como a quantidade necessária para diminuir, de igual modo, a concentração de EPT presente na parte edível da alface. Deste modo, a adicionou-se 1 % de cortiça em pó e 0,5 % de estrume de cavalo seco.

Após uma análise da concentração do EPT na cortiça em pó e estrume de cavalo seco, foi possível verificar que os teores de Cd e Pb se encontravam abaixo do limite de deteção para ambos os corretivos. Os valores obtidos para os outros EPTs foram tidos em conta no planeamento dos ensaios tanto para a cortiça (7,2±7,2 mg Ni kg<sup>-1</sup>; 1,6±0,2 mg Cr kg<sup>-1</sup>; 18,9±3,0 mg Zn kg<sup>-1</sup>) como para o estrume (1,6±7,7 mg Ni kg<sup>-1</sup>; 4,7±0,3 mg Cr kg<sup>-1</sup>; 99,7±6,1 mg Zn kg<sup>-1</sup>).

A metodologia aplicada para a preparação dos vasos consistiu na adição ao solo previamente contaminado para as diferentes modalidades do ensaio, os corretivos orgânicos (cortiça e estrume) e os adubos de fundo, sendo, posteriormente, feita a sua homogeneização. Os solos assim preparados foram distribuídos por vasos que repousaram, durante 1 dia, para estabilizar a humidade do solo.

Após este período, iniciou-se a 3ª etapa do ensaio, no carro porta-vasos, com os vasos distribuídos de forma aleatória. Transplantou-se para cada vaso uma planta de alface (4-5 folhas) previamente produzida em alvéolos com turfa. Para reduzir eventuais diferenças ao nível da intensidade luminosa e temperatura nas diversas modalidades procedeu-se regularmente à rotação dos vasos (**Figura 6.8**).



**Figura 6.8** – Registro fotográfico ilustrativo dos ensaios de avaliação do efeito da adição de corretivos orgânicos em solo. A-plantas de alface previamente produzidas em alvéolos com turfa; B-plantas de alface em desenvolvimento; C-ensaio no carro porta-vasos; D-ensaio instalado na estufa de vegetação exterior.

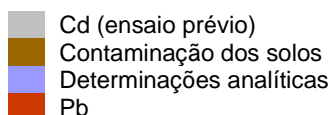
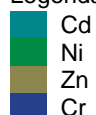
### 6.3.3. Instalação dos ensaios

Os ensaios para avaliação do efeito da adição de corretivos orgânicos em solo foram realizados entre 2015 e 2016 (**Tabela 6.10**) e decorreram na estufa de vegetação exterior do Horto de Química Agrícola do Instituto Superior de Agronomia.

**Tabela 6.10** – Cronograma das tarefas realizadas para os ensaios de avaliação do efeito da adição de corretivos orgânicos em solo.

Ano	Mês											
	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
2015		Cd		Ni		Zn			Cr		Pb	
									Cd			
											Ni	
2016	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
	Ni											
	Zn											
			Cr									
					Pb							

Legenda:





Antes de se iniciar os ensaios definitivos foi necessário fazer um ensaio prévio para se fazer o delineamento experimental. O ensaio prévio foi realizado com a contaminação do solo com Cd ( $12 \text{ mg de Cd kg}^{-1}$ ) e foram testadas as seguintes modalidades: (a) solo contaminado, sem a adição de corretivos orgânicos; (b) solo contaminado, com a adição de 0,5 % ou 1 % cortiça; (c) solo contaminado, com a adição de 0,5 % ou 1 % de estrume; (d) solo não contaminado sem e com a adição de cortiça ou estrume, para as duas concentrações utilizadas. Este ensaio prévio permitiu esclarecer o tempo necessário para esta cultivar atingir um tamanho adequado, definir a adubação, as quantidades de corretivos a aplicar, as condições de rega e a metodologia adequada à instalação do ensaio.

#### **6.3.4 Colheita, amostragem e conservação de amostras**

As alfaces foram colhidas ao fim de 80 dias de crescimento e, para cada uma, foi registada a sua massa fresca (MF) desprezando a raiz. Fez-se também o registo fotográfico das plantas obtidas para cada modalidade no final do ensaio.

Na colheita e conservação das amostras, a metodologia adaptada para manusear o material vegetal, seco e fresco, está descrita em **2.2.1**. Nestes ensaios em solo, parte do material vegetal foi seco (massa seca, MS), para se obter o teor de elementos químicos e a outra parte, correspondendo ao material vegetal fresco, foi congelada em azoto líquido e conservada, a  $-80^\circ\text{C}$ , para as determinações analíticas posteriores.

Em todas as modalidades foi colhido material vegetal para secar. No material vegetal fresco, apenas se guardou amostras controlo (MOD. 1, 2, 3) e contaminadas com a menor (MOD. 4, 5, 6) e maior concentração (MOD. 13, 14, 15) de EPT.

Foram também colhidas amostras de solo, no mesmo período de tempo, para cada modalidade. A amostragem foi realizada como descrito em **2.2.2**.

#### **6.3.5. Determinações analíticas**

Para o material vegetal seco, a determinação da concentração de elementos químicos foi efetuada segundo a metodologia descrita em **2.3.1**. O objetivo foi verificar se ocorreu acumulação de EPT por parte da planta e, se essa acumulação, é atenuada pela presença de corretivos orgânicos.

O material vegetal fresco permitiu fazer uma série de análises por espectrofotometria de absorção molecular descritas em **2.3.2**. As determinações analíticas foram escolhidas tendo



por base os resultados obtidos no **Capítulo V**. Na **Tabela 6.11** estão descritas as determinações efetuadas, com material vegetal seco e fresco, para a parte aérea das plantas de alface.

**Tabela 6.11** – Determinações analíticas efetuadas, com material vegetal seco e fresco, para a planta adulta.

	material vegetal seco	material vegetal fresco
parte aérea	- concentração do EPT e elementos químicos: digestão ácida (2.3.1.1.); ICP-OES (2.3.1.3.).	- atividade antioxidante total (2.3.2.3.)
		- polifenóis totais (2.3.2.4.)
		- APX (2.3.2.9.6.)
		- PAL (2.3.2.9.8.)
		- ASA (2.3.2.7.)
		- clorofila a, b, total (2.3.2.5.)
		- antocianinas (2.3.2.6.)

As análises efetuadas aos solos, para todas as modalidades, estão descritas no **Capítulo II (2.4.)** e encontram-se sumarizadas na seguinte tabela:

**Tabela 6.12** – Determinações analíticas efetuadas para o solo.

	material seco
solo	pH (H <sub>2</sub> O) (1:2,5) (2.4.1.)
	carbono orgânico total e matéria orgânica (%) (2.4.2.)
	fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) e potássio (K <sub>2</sub> O) extraíveis (mg kg <sup>-1</sup> ) (2.4.3.)
	concentração de elementos químicos da fração pseudototal (2.4.6.) e fração extraível (2.4.7.) (mg kg <sup>-1</sup> )

Nestes ensaios foram determinadas as concentrações do elemento químico utilizado como contaminante em plantas e solo por ICP-OES e as condições experimentais utilizadas encontram-se descritas no **Anexo A** (na **Tabela A3**). No solo determinou-se a concentração do EPT presente na fração pseudototal e extraível.

### 6.3.5.1. Acumulação de EPT

Para se caracterizar a acumulação das plantas de alface foram ajustados modelos matemáticos, com base na metodologia descrita no **Capítulo IV (4.3.5.2.)**, que refletiam o



comportamento dos valores de acumulação de cada EPT em função da concentração de elemento presente no solo para cada modalidade em estudo.

#### **6.3.5.2. Índices para avaliação da toxicidade dos EPTs estudados**

Os cálculos relativos à humidade e à diminuição percentual da biomassa da parte aérea e da raiz de plantas contaminadas encontram-se descritos em **4.3.5.3. (Capítulo IV)**.

##### **6.3.5.2.1. Ingestão diária estimada**

A ingestão diária estimada (IDE) foi adaptada de Pinto et al. (2014) e é utilizada para avaliar a ingestão adequada de elementos nutricionais provenientes das alfaces produzidas nestes ensaios. A IDE é calculado através da seguinte expressão:

$$IDE = ID_P \times C_{EPT} \text{ (mg dia}^{-1}\text{)}$$

em que,

$C_{EPT}$  é o teor de elemento químico presente na parte edível da alface, mg kg<sup>-1</sup>.

$ID_P$  corresponde ao valor médio de ingestão média diária de alface, considera-se um valor de 22,5 g dia<sup>-1</sup> para adultos (WHO, 2003).

##### **6.3.5.2.2. Fator de transferência do solo**

O fator de transferência (FT) do solo para a alface é calculado através da seguinte expressão:

$$FT = \frac{C_P}{C_S}$$

em que,

$C_P$  é o teor total de elemento químico na parte edível da alface, mg kg<sup>-1</sup>.

$C_S$  é o teor pseudototal de elemento químico presente no solo, mg kg<sup>-1</sup>.

O cálculo do FT foi adaptado no descrito por Pinto et al. (2014) e pode ser utilizado para verificar a capacidade que as plantas têm em transferir os elementos do solo para a sua parte edível.



#### 6.3.5.2.3. Índice de tolerância

O Índice de Tolerância (IT) foi calculado usando a seguinte fórmula (Rossato et al., 2011):

$$IT = \frac{MF_{EPT}}{MF_{CT}} \times 100$$

em que,

$MF_{EPT}$  é a massa fresca, da parte edível, de plantas de alface desenvolvidas numa modalidade com meio contaminado, g.

$MF_{CT}$  é a massa fresca, da parte edível, de plantas de alface desenvolvidas numa modalidade controle, g.

O índice de tolerância pode ser superior a 100 %, o que demonstra que existiu um estímulo da variável em estudo, caso seja inferior a 100 %, significa que o EPT levou à sua diminuição.

#### 6.3.6 Tratamento estatístico

No tratamento estatístico irá dar-se relevância a dois fatores: o efeito do corretivo orgânico adicionado e o efeito da concentração de EPT aplicado.

Aos resultados foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) a um fator (SPSS 13.0, *SPSS Inc.*) que permitiu avaliar o efeito do fator concentração de EPT aplicado e as diferenças existentes entre as modalidades (S, SC, SE), nas determinações analíticas descritas em **6.3.5**. Para se determinar se existiram diferenças significativas entre as médias, das amostras controle e contaminadas, utilizou-se o teste Tukey, com um nível de confiança de 95 %.

As letras minúsculas refletem se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos (MOD.1, 4, 7, 10, 13), com adição de cortiça (MOD. 2, 5, 8, 11,14) e com adição de estrume (MOD. 3, 6, 9, 12, 15) para cada uma das concentrações de EPT aplicado (controle,  $[EPT_1]$ ,  $[EPT_2]$ ,  $[EPT_3]$  e  $[EPT_4]$ ), ou seja, se para a concentração de  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd adicionada ao solo, por exemplo, existem diferenças significativas quando não se aplica nenhum corretivo, quando se incorpora cortiça ou quando se adiciona estrume. Neste caso, estudou-se o efeito da adição do corretivo orgânico.

As letras maiúsculas dizem respeito às diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controle (MOD.1) e amostras contaminadas  $[EPT_1]$  (MOD.4),  $[EPT_2]$  (MOD.7),  $[EPT_3]$  (MOD.10) e  $[EPT_4]$  (MOD.13), quando não se aplica corretivo, com adição de cortiça





ou com incorporação de estrume. Ou seja, se existem diferenças significativas entre as amostras controle, 1,5, 3, 6 e 12 mg kg<sup>-1</sup> de Cd, por exemplo, quando se adicionou cortiça ao solo. Neste caso, estudou-se o efeito da concentração de EPT aplicado.

A análise multivariada foi realizada usando o programa R 1.0.136 (RStudio, Inc.). A Análise em Componentes Principais (ACP) permitiu avaliar a forma como estão relacionadas as variáveis em estudo. A ACP foi realizada baseada na matriz de correlação entre 6 variáveis normalizadas: *parte edível* ([EPT] na parte edível, mg kg<sup>-1</sup>), *pseudototal* ([EPT] na fração pseudototal, mg kg<sup>-1</sup>), *extraível* ([EPT] na fração extraível), *pH*, *m.o.* (%) e *MF* (massa fresca da parte edível, g).

A análise de partição por *clusters* (PAM) foi realizada utilizando também a matriz de correlação com os dados dessas 6 variáveis normalizadas. A PAM foi realizada definindo-se, à priori, a formação de 3 *clusters* permitindo classificar em classes, distribuir e diferenciar os indivíduos com base na concentração de EPT e na modalidade aplicada (S-sem adição de corretivos; SC-adição de cortiça; SE-adição de estrume).

#### 6.4. Resultados e Discussão

Neste subcapítulo, primeiro irá ser realizada a caracterização do solo artificialmente contaminado com o EPT. De seguida, irá analisar-se a acumulação do EPT na parte edível da alface M4E e verificar qual o efeito da adição de corretivos orgânicos aos solos artificialmente contaminados. Para além disso, vão ser identificados os sintomas visíveis de toxicidade e vai ser efetuada uma avaliação de como os parâmetros vegetativos são afetados pela presença do EPT. Posteriormente, de modo a identificar os mecanismos antioxidantes subjacentes à capacidade de tolerância vai-se caracterizar a resposta da planta. Por fim, irá ser desenhada uma avaliação da resposta da planta face à toxicidade induzida pelo EPT. A apresentação e discussão dos resultados, irá ser realizada para cada EPT, sendo efetuada primeiro para o Cd, seguido do Cr, Pb, Ni e, por fim, o Zn.

Tal como verificado no **Capítulo IV** e **V**, a maior parte dos estudos para avaliar a tolerância e acumulação de EPTs nas plantas são maioritariamente realizados em solução nutritiva, uma vez que apresentam uma composição conhecida em contraste com os ensaios realizados em solo, onde existem muitos parâmetros ambientais menos controláveis. Embora as culturas hidropónicas ofereçam um sistema conveniente para estudar processos biológicos, a extrapolação para sistemas de plantas em condições de campo não é direta, uma vez que o processo de acumulação de EPTs pelas plantas é influenciado pela concentração de EPTs,



propriedades físicas e químicas do solo, a presença de exsudatos radiculares na rizosfera, e atividade microbiana do solo, entre outros (Choppala et al., 2016; Pelfrêne et al., 2012; Szolnoki e Farsang, 2013; Varennes, 2003).

Para investigar as tendências comuns e divergentes da planta de alface e, concluir sobre a extrapolação de dados dos ensaios sem solo para os ensaios com solo, é importante testar em paralelo o desempenho da mesma espécie de alface, em culturas hidropônicas e em solo, como feito no presente estudo.

#### 6.4.1. Cádmio

##### 6.4.1.1. Caracterização do solo artificialmente contaminado com Cd

Na **Figura 6.9-a** apresentam-se as medições dos valores pseudototais de Cd no solo que são bastante próximos dos valores nominais (a quantidade teoricamente adicionada). As frações extraíveis, considerando a maior contaminação de cádmio, correspondem a 1,92, 1,91 e 1,82 %, do total presente no solo S, SC e SE, respetivamente (**Figura 6.9-b**).

É possível também verificar que não existem diferenças significativas na quantidade de Cd, presente em ambas as frações, entre os solos sem adição de corretivos (S), solos com adição de cortiça (SC) e solos com estrume de cavalo (SE). Geralmente, a concentração de Cd no solo (fração pseudototal) não é diminuída pela utilização de corretivos orgânicos, mas existe a diminuição da sua biodisponibilidade para a planta (fração extraível). No entanto, ao contrário do que seria de esperar, estes dados mostram que a presença destes dois corretivos orgânicos não teve influência na fração extraível.

Segundo o Decreto-lei (n.º 276/2009), o valor de máximo de Cd em solos neutros, aos quais se pretende adicionar lamas de depuração, é de 3,0 mg Cd kg<sup>-1</sup>. Se considerarmos solos em que se pretende aplicar matéria fertilizante, o valor é de 1 mg Cd kg<sup>-1</sup> (Decreto-Lei, n.º 103/2015 ). A legislação canadiana define o valor de 1,0 mg Cd kg<sup>-1</sup> para uso agrícola. A legislação holandesa refere o valor referência é de 0,8 mg Cd kg<sup>-1</sup> e o valor de intervenção é de 12 mg Cd kg<sup>-1</sup> (Leitão et al., 2016b). No caso do Canadá os valores são definidos em função dos usos do solo, na legislação holandesa apenas tem o valor de referência e de intervenção.

Os resultados obtidos para o pH (**Figura 6.10-a**), fósforo extraível (**Figura 6.10-c**) e potássio extraível (**Figura 6.10-d**) não indicam grandes variações entre a amostra controlo e amostras contaminadas, bem como entre as diferentes modalidades. Os valores de K<sub>2</sub>O encontram-se elevados (100-200) e os de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> muito elevados (> 200). Como seria de esperar,



relativamente aos valores obtidos para a matéria orgânica existe um aumento significativo nas modalidades SC e SE, relativamente à amostra S (**Figura 6.10-b**). Para além disso, também não se verificam diferenças significativas entre as amostras controlo e contaminadas.

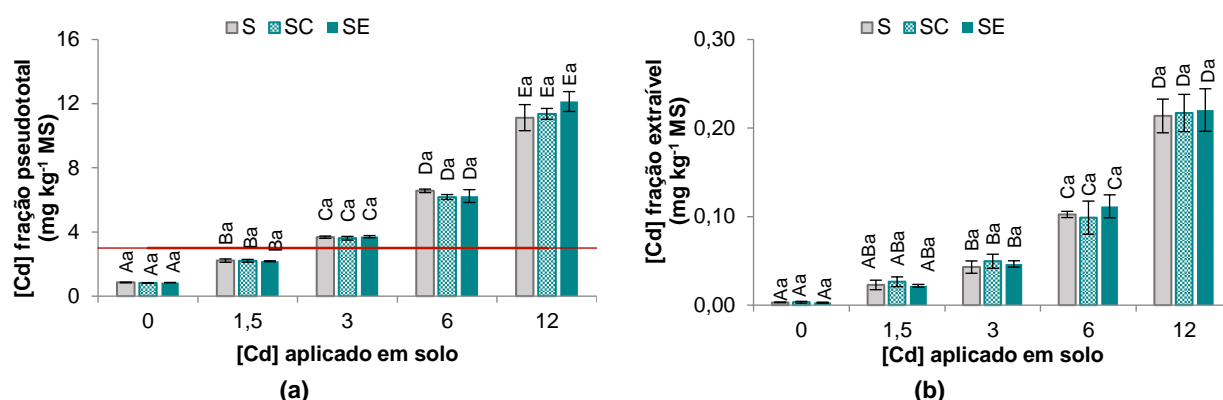
Normalmente, a utilização de corretivos orgânicos num solo contaminado com Cd evita a transferência de Cd presente no solo para a planta, aumentando o pH do solo. Por este motivo, à medida que o pH do solo aumenta, as concentrações de Cd na solução do solo tendem a diminuir e a acumulação de Cd pelas plantas também diminui. Normalmente, o pH do solo aumenta com o aumento da m.o. no solo e limita a absorção de Cd pelas plantas (Khan et al., 2017). No entanto, no presente estudo este efeito não se verificou, uma vez que os valores médios de pH do solo encontram-se perto da neutralidade (S:  $6,98 \pm 0,10$ ; SC:  $7,20 \pm 0,13$ ; SE:  $7,11 \pm 0,11$ ).

Por outro lado, a presença de m.o. no solo converte o Cd que está solúvel/permutável numa fração orgânica onde este elemento se encontra ligado, e por isso, diminui a sua absorção pela planta. Os ligandos e/ou grupos funcionais presentes nos corretivos orgânicos têm elevada afinidade com o Cd. Neste sentido, o teor de Cd presente na solução do solo diminui, com o aumento do teor de m.o., resultando num aumento de ligação do Cd ao solo. Ao contrário do que seria de esperar, apesar do teor de m.o. aumentar nas modalidades onde foram adicionados corretivos, o teor de Cd extraível não diminui significativamente, considerando as modalidades onde houve adição de corretivos.

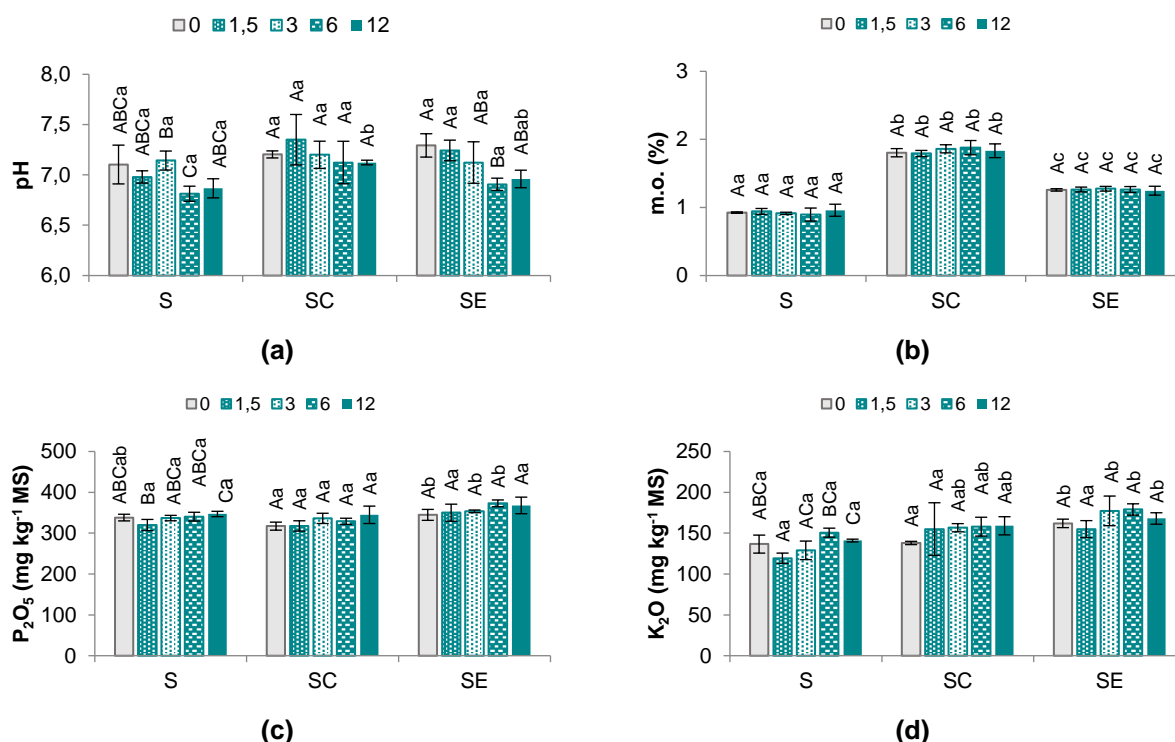
#### **6.4.1.2. Caracterização da acumulação de Cd em alface**

O comportamento da acumulação de Cd, na parte edível da alface M4E, em função da concentração de Cd aplicado em solo, para as diferentes modalidades em estudo, encontra-se apresentado na **Figura 6.11**.

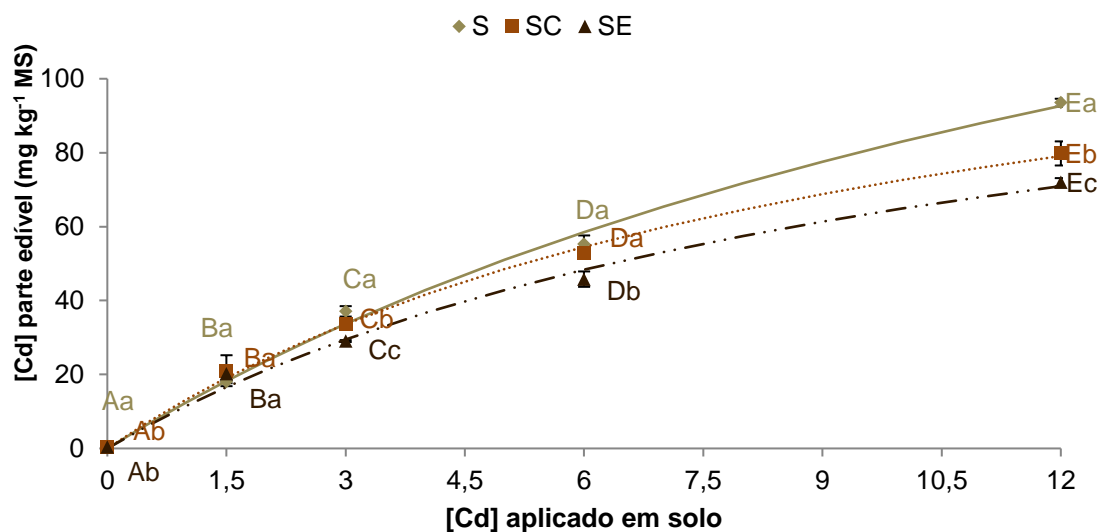
Tal como seria de esperar, é possível verificar que à medida que se aumenta a concentração de Cd, a planta tem tendência a acumular uma maior quantidade deste elemento, sendo isto visível para todas as concentrações de Cd aplicadas no solo.



**Figura 6.9** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Cd e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com adição de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) concentração pseudototal de Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) e (b) concentração de Cd na fração extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS). As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Cd aplicado ( $n=3$ ). A linha **a vermelho** representa o valor máximo de Cd que pode estar presente nos solos ( $3,0 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ).



**Figura 6.10** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Cd e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com adição de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) pH, (b) matéria orgânica (%), (c) fósforo extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) e (d) potássio extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS). As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Cd aplicado ( $n=3$ ).



dias	C <sub>máx</sub>	K <sub>Cd</sub>	R <sup>2</sup>	Linha
S	222,3	16,8	0,9955	—
SC	143,9	9,8	0,9980	.....
SE	133,5	10,6	0,9926	- - -

**Figura 6.11** – Concentração de Cd na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 1,5, 3, 6 e 12 mg Cd kg<sup>-1</sup>, com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com adição de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controle e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Cd aplicado ( $n=3$ ).

Outros autores também obtiveram resultados da acumulação de Cd em plantas alimentares em estudos realizados em solos contaminados. De acordo com Kabata-Pendias e Pendias (2001), o teor normal de Cd na folha de alface varia, frequentemente, entre 0,66 a 3,0 mg Cd kg<sup>-1</sup> (MS). Quando as concentrações de Cd variam entre 10 e 95 mg Cd kg<sup>-1</sup> (MS), considera-se que é tóxica para as plantas de alface. Noutro estudo realizado com alface Pereira et al. (2011) verificaram que a concentração de Cd na parte aérea aumentou proporcionalmente com o aumento da disponibilidade de Cd no solo, havendo uma acumulação entre 55-100 mg kg<sup>-1</sup> (MS).

Baldantoni et al. (2016b) observaram que a disponibilidade de Cd (fração extraível), depende não apenas da sua fração pseudototal mas também das interações complexas entre as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. Para além disso, as interações entre a planta e o solo, ao nível da rizosfera, são fundamentais na determinação da fração extraível de Cd, que pode diferir conforme o extratante. Para a alface, demonstraram que a quantidade de Cd que se acumula na parte aérea depende muito da espécie, cultivar, fertilização do solo,



entre outros. Farooq et al. (2008), por exemplo, observaram que as concentrações de Cd em folhas de alface foram 3 vezes superiores às obtidas nas raízes. Segundo Sampaio et al. (2009), a alface também tem a capacidade de acumular elevadas concentrações de Cd na parte aérea a partir de solos contaminados.

A acumulação de Cd foi ajustada a curvas hiperbólicas, referidas em **6.3.5.1**. Estes ajustes e os respetivos parâmetros, estão representados na **Figura 6.11**. Nestas condições de ensaio, verifica-se que existe um ajuste razoável ao modelo hiperbólico, tal como indicam os valores de  $R^2$  obtidos.

O coeficiente  $C_{m\acute{a}x}$ , que representa o patamar de concentração máxima de Cd absorvido pela planta é superior na modalidade S (222,27), em relação às modalidades SC (149,93) e SE (133,50), ou seja, este valor é mais baixo com a adição de corretivos ao solo, sendo o efeito do estrume de cavalo mais acentuado do que o da cortiça.

A planta de alface M4E parece continuar a acumular este metal na parte aérea e existem diferenças significativas entre as plantas contaminadas com 6 e 12 mg Cd kg<sup>-1</sup>, para todas as modalidades em estudo, evidenciando que ainda não se atingiu uma presumível saturação. Este ajuste a este modelo também foi utilizado por Chen et al. (2008) em alface exposta a diferentes concentrações de Cd em solo. Os autores referem que a absorção de Cd pela planta aumenta com o aumento da concentração de Cd na solução do solo e, gradualmente, aproxima-se de um nível de saturação.

No presente estudo, como se pode verificar pela **Figura 6.11**, considerando as plantas de alface expostas a 12 mg Cd kg<sup>-1</sup>, existem diferenças significativas no teor de Cd presente, em relação ao controlo, para todas as modalidades estudadas. Quando não se adicionaram corretivos, observa-se uma acumulação máxima de Cd nas folhas da alface (93,52±1,07 mg Cd kg<sup>-1</sup>). Com a adição dos corretivos orgânicos, é possível verificar que ocorre uma diminuição acentuada da acumulação deste metal nas plantas onde se adiciona cortiça (79,80±3,26 mg Cd kg<sup>-1</sup>) ou estrume (72,01±1,11 mg Cd kg<sup>-1</sup>). Esta diminuição é ligeiramente maior na modalidade em que se adiciona estrume de cavalo. A adição de estrume de cavalo provoca uma diminuição na absorção de Cd, por comparação com a situação sem corretivo, de 23,0 %. A adição de cortiça não foi tão eficiente, levando a uma redução de 14,7 %.

Existem diversos estudos sobre a aplicação de estrume a solos contaminados, verificando-se de um modo geral uma diminuição da disponibilidade dos metais para as plantas (Clemente et al., 2006; Lee et al., 2009). No entanto, o efeito é dependente do tipo de corretivo e da planta, tendo Bai et al. (2012) reportado um aumento da absorção de Cd por arroz com a



aplicação de palha de trigo no solo. Woldetsadik et al. (2016) referiram que o *biochar* de estrume de bovino demonstrou ter um elevado potencial em promover a imobilização do Cd e na resposta de crescimento da alface em solos agrícolas contaminados com Cd.

Em relação aos resíduos de cortiça, não existem estudos efetuados sobre a sua capacidade de adsorção de metais no solo, existindo apenas algumas referências da sua utilização como material adsorvente em gases, águas e efluentes (Pintor et al., 2012). Kim et al. (2015) referiram que a adição de *biochar* à base de papel foi o mais efetivo no aumento do rendimento das plantas de alface através da diminuição da concentração de Cd.

Este efeito da adição de corretivos ricos em matéria orgânica na diminuição de Cd acumulado nas plantas também foi verificado por outros autores (Chen et al., 2010; Domańska et al., 2015; Hao et al., 2012; Hmid et al., 2015; Houben et al., 2013; Liu et al., 2009; Sato et al., 2010; Shaheen et al., 2017; Younis et al., 2016; Younis et al., 2015; Zhang et al., 2014b).

Se considerarmos o teor de Cd presente na parte edível de plantas expostas a  $1,5 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  ( $5,82 \pm 0,13 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  MF (S),  $6,78 \pm 1,35 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  MF (SC) e  $6,53 \pm 0,09 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  MF (SE)) e plantas contaminadas com  $12 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  ( $30,17 \pm 0,34 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  MF (S),  $25,74 \pm 1,05 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  MF (SC) e  $23,23 \pm 0,36 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  MF (SE)), é possível verificar que ultrapassa, em qualquer um dos casos, o valor permitido por lei de  $0,2 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  MF (Comission Regulation (EU) 488/2014), para qualquer uma das modalidades em estudo (S, SC e SE).

Na **Tabela 6.13** estão os resultados obtidos para o fator de transferência do solo que permitem verificar a capacidade que as plantas de alface têm em transferir o Cd presente no solo para a sua parte edível, sendo um fator para controlar a exposição humana aos EPTs através da cadeia alimentar. Geralmente, o FT de Cd varia entre 1 a 10 (Pavlíková et al., 2004) e menores valores de FT representam um transporte de Cd menor para a parte edível das plantas de alface.

É possível verificar que o FT permanece aproximadamente constante para a modalidade S, ou seja, a presença de uma quantidade maior de Cd em solo não altera a capacidade de absorção de cádmio pela parte edível da planta. Isto indica que a acumulação da planta, permanece constante para o intervalo de concentração de Cd aplicado. No entanto, nas modalidades SC e SE existe uma diminuição gradual desta capacidade, que é mais evidente na modalidade SE. Estes resultados estão concordantes com os obtidos para a acumulação de Cd em cada modalidade (**Figura 6.11**). Neste sentido, a adição de estrume de cavalo, provavelmente, diminui ligeiramente a capacidade da planta em transferir o cádmio presente no solo para a parte edível da planta.





**Tabela 6.13** – Fator de transferência do solo para a alface M4E que se desenvolveu em solo, sujeita a diferentes concentrações de Cd e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com adição de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

Modalidade	Fator de transferência (FT)				
	[Cd] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	1,5	3	6	12
S	0,7	8,1	10,1	8,4	8,4
SC	0,5	9,5	9,3	8,5	7,0
SE	0,5	9,3	7,8	7,3	5,9

Pereira et al. (2011) obtiveram um valor de FT de 43,8 para a alface, comparativamente ao obtido para o arroz (8,9), evidenciando a grande capacidade da alface em transportar o Cd para a parte aérea. Vários autores obtiveram os seguintes valores de FT em alface: 0,0384 para uma concentração de 5,54 mg Cd kg<sup>-1</sup> solos ((Kachenko e Singh, 2006), 1,07 para uma concentração de 0,84 mg Cd kg<sup>-1</sup> (Khan et al., 2008b), 0,85 para uma concentração de 0,99 mg Cd kg<sup>-1</sup> solo (Khan et al., 2010), 4,69 para uma concentração de 0,9 mg Cd kg<sup>-1</sup> solo (Luo et al., 2011), 0,897 para uma concentração de 16,7 mg Cd kg<sup>-1</sup> solo, (Waterlot et al., 2013), 0,346 para uma concentração que varia entre 0,52-4,5 mg Cd kg<sup>-1</sup> solo (Augustsson et al., 2015) e 0,11 para uma concentração de 1,2 mg Cd kg<sup>-1</sup> solo (Xu et al., 2013). Tal como se pode verificar, os valores de FT para Cd variam de acordo com as cultivares de plantas e, principalmente, dependem de fatores como pH, textura, material orgânico, tipo de solo, entre outros (Khan et al., 2017).

#### 6.4.1.3. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade

Na **Figura 6.12** encontram-se os resultados obtidos para a massa fresca da parte aérea, bem como os sintomas visíveis de toxicidade observados na alface M4E.

A nível visual (**Figura 6.12-a**) não se verifica um efeito tóxico deste elemento nas plantas de alface nestas condições de ensaio, apenas se observa que as plantas onde se adiciona estrume de cavalo no solo apresentam um desenvolvimento ligeiramente superior às plantas que cresceram sem adição de corretivos. As plantas onde se adiciona a cortiça ao solo, apresentaram uma aparente ligeira diminuição do seu crescimento, mas que não se reflete na massa da planta.



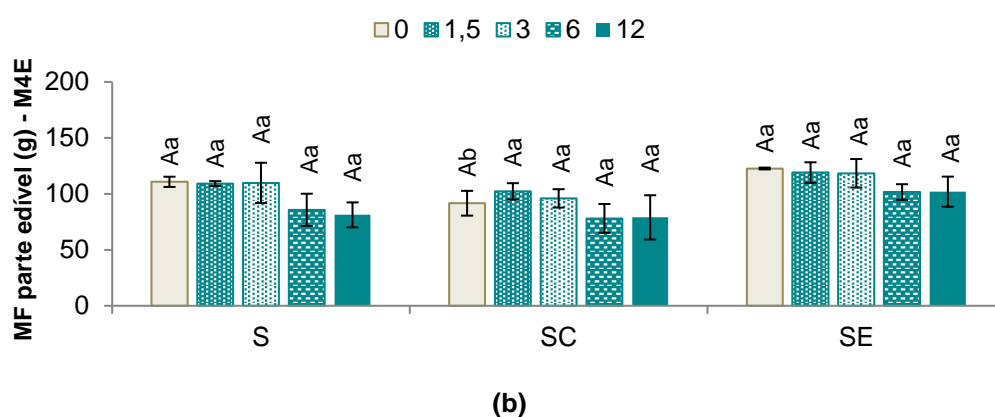
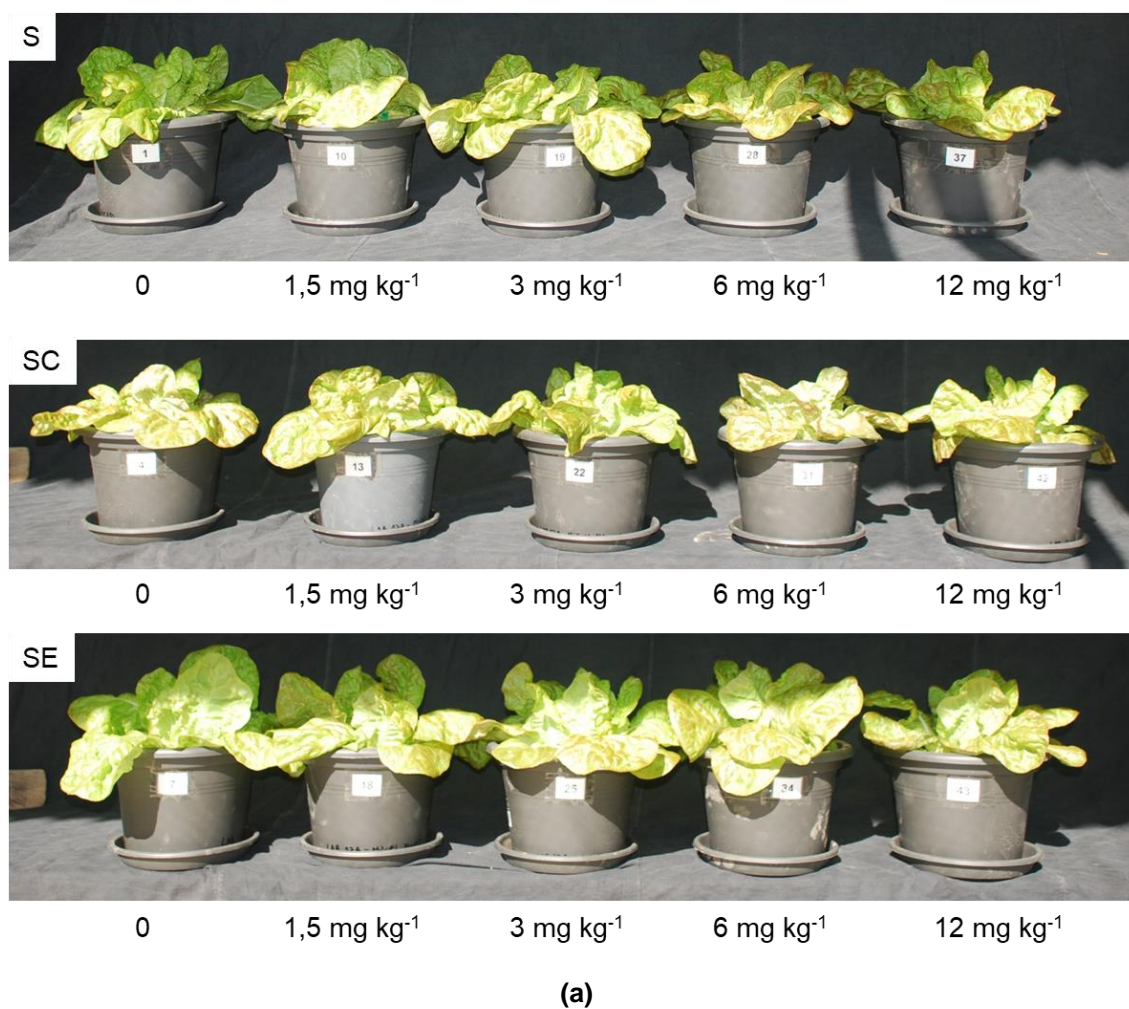
Num estudo realizado por Roy e McDonald (2015), as plantas de espinafre e alface apresentaram sintomas de toxicidade aguda durante a fase inicial de crescimento para uma concentração de  $96 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ , bastante superior à utilizada no presente estudo.

Apesar de se ter verificado uma menor acumulação de Cd nas plantas que cresceram num meio com adição de pó de cortiça e estrume de cavalo, é possível verificar que não existem diferenças significativas na massa fresca da parte edível de plantas contaminadas com diferentes concentrações de Cd, nem entre as modalidades em estudo (S, SC e SE). Apenas se verifica uma ligeira diminuição, mas que não é significativa em relação à amostra controlo, na massa fresca de plantas expostas a 6 e  $12 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  para as 3 modalidades em estudo (**Figura 6.12-b**).

Os valores percentuais de diminuição da biomassa das plantas contaminadas com a maior concentração de cádmio, comparativamente às plantas controlo, correspondem a 26,6, 13,8 e 16,9 %, para as modalidades S, SC e SE, respetivamente.

Pereira et al. (2011) fazem referência a estudos onde não se observou uma diminuição na massa seca de alface, apesar das elevadas concentrações de Cd presentes na parte aérea, evidenciando uma grande tolerância da planta de alface ao cádmio. Outros autores referem um efeito negativo do Cd aplicado no solo, em concentrações superiores às utilizadas no presente estudo, na biomassa de batata ( $15, 30, 45, 60 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ) (Hassan et al., 2016) e rabanete ( $0, 50, 100, 200 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ) (Varalakshmi e Ganeshamurthy, 2013). Rizwan et al. (2017) referiram que o crescimento da planta e a biomassa depende da espécie do vegetal, assim como da dose e duração da exposição ao cádmio.

O não aparecimento de sintomas visíveis de toxicidade, apesar da acumulação significativa de cádmio no presente estudo, mostra que as concentrações de Cd utilizadas que não foram suficientes, apesar de muito elevadas, para induzir uma resposta maior na planta. Para além disso, a alface poderá reter o Cd na raiz, por adsorção ou fixação às paredes celulares, ou ligados a exsudados extracelulares, formando quelatos e sendo armazenado no vacúolo, permitindo a proteção celular e a retenção de uma quantidade elevada de Cd na raiz (Rascio e Navari-Izzo, 2011). Por outro lado, poderão existir mecanismos de destoxificação eficientes na parte aérea, que vão ser discutidos posteriormente.



**Figura 6.12** – Massa fresca da parte edível (a) e o registo fotográfico (b) de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo contaminado com Cd e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Cd aplicado ( $n=3$ ).



#### 6.4.1.4. Avaliação do risco associado à ingestão de Cd

É importante fazer a avaliação do risco associado à ingestão de cádmio para tentar perceber a quantidade de Cd a que poderá estar exposta a população portuguesa através da ingestão de alface contaminada, uma vez que Portugal é um grande consumidor de alface na Europa (Pinto et al., 2014). Na **Tabela 6.14** encontram-se os resultados obtidos para a ingestão diária estimada de Cd através do consumo de alface e na **Tabela 6.15** estão os valores dos parâmetros de avaliação do risco de Cd na saúde dos seres humanos.

**Tabela 6.14** – Ingestão diária estimada da parte edível de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Cd e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

Modalidade	IDE (mg dia <sup>-1</sup> )*				
	[Cd] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	1,5	3	6	12
S	0,0042	0,1310	0,2692	0,4011	0,6788
SC	0,0031	0,1526	0,2442	0,3832	0,5792
SE	0,0030	0,1470	0,2108	0,3324	0,5227

\*considerando o valor médio de ingestão média diária de alface de 22,5 g dia<sup>-1</sup> para adultos (WHO, 2003).

A ingestão média diária de alface é de 22,5 g dia<sup>-1</sup> para adultos (WHO, 2003) e considera-se um teor médio de humidade nas plantas de alface de 96,9 %. Através dos dados obtidos no presente estudo é possível verificar que a ingestão diária de Cd estimada varia entre 0,5227 e 0,6788 mg dia<sup>-1</sup>, considerando o caso mais grave de contaminação (12 mg Cd kg<sup>-1</sup>). Para o nível de contaminação mais baixo (1,5 mg Cd kg<sup>-1</sup>) estes valores variam entre 0,1310 e 0,1526 mg dia<sup>-1</sup>.

De acordo com os dados obtidos, considerando um homem adulto de 70 kg, a ingestão diária de Cd estimada varia entre 7,47-9,70 µg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (considerando o caso mais grave de contaminação) e entre 1,87-2,18 µg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (considerando o caso menos grave de contaminação).

Segundo a ATSDR (2013a), considerando a dose de referência de uma substância tóxica, que provavelmente não terá risco significativo de efeitos nocivos durante a vida, de 1 µg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, é possível verificar que todas as plantas contaminadas com cádmio apresentam um risco adverso associado.



**Tabela 6.15** – Parâmetros de avaliação do risco associado à exposição ao Cd para a saúde do ser humano.

Parâmetros de avaliação do risco	Valores referência obtidos para o Cd	Referências Bibliográficas
<i>NOAEL</i>	0,01 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	(Hough et al., 2004b)
<i>RfD</i>	1 x 10 <sup>-3</sup> mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	(ATSDR, 2013a)
<i>MRLs</i>	0,1 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	(ATSDR, 2013a)
<i>TWI</i>	7 µg kg <sup>-1</sup> 2,5 µg kg <sup>-1</sup>	(ATSDR, 2013a) (EFSA, 2012; EFSA, 2011)
<i>PTMI</i>	25 µg kg <sup>-1</sup>	(EFSA, 2012; EFSA, 2011)

- *NOAEL* (do inglês, *No Observed Adverse Effect Level*) - concentração ou quantidade máxima de substância, que não causa efeito adverso num organismo vivo.

- *RfD* - dose de referência ou dose oral máxima aceitável de uma substância tóxica, que provavelmente não terá risco significativo de efeitos nocivos durante a vida.

- *MRL* - nível mínimo de risco, devido à exposição crônica por via oral, sem haver risco de efeitos adversos para a saúde.

- *TWI* – (do inglês, *tolerable weekly intake* - *TWI*) - ingestão semanal tolerável de uma substância potencialmente nociva ou contaminante de alimentos que pode ser ingerida ao longo da vida sem risco de efeitos adversos para a saúde.

- *PTMI* - (do inglês, *Provisional Tolerable Monthly Intake* - *PTMI*) – ingestão mensal tolerável provisória sem risco de efeitos adversos para a saúde.

O nível mínimo de risco, devido à exposição crônica por via oral, sem haver risco de efeitos adversos para a saúde é de 0,1 µg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> para o cádmio, e os valores obtidos no presente estudo para todas as plantas contaminadas com cádmio são superiores a este valor. Outros autores verificaram que existe um risco associado à ingestão de vegetais de folha, como a alface, cultivados em solos contaminados com Cd (Khan et al., 2015; Roy e McDonald, 2015; Saha e Zaman, 2013).

Segundo a ATSDR (2013a), a maior parte do Cd ingerido passa através do trato gastrointestinal de forma inalterada. O Cd absorvido é eliminado principalmente através da urina e a concentração urinária de Cd reflete a carga corporal total. Normalmente, a taxa de excreção é baixa porque o Cd permanece fortemente ligado às metalotioneínas, sendo quase completamente reabsorvido nos túbulos renais. Como a excreção é lenta, a acumulação de Cd no corpo pode ser significativa. Os rins e o fígado contêm cerca de 50 % do Cd acumulado no organismo. O tempo de semi-vida biológico do Cd no rim é estimado entre 6 a 38 anos, enquanto no fígado é de 4 a 19 anos. Estes tempos de meia-vida longos refletem que os



humanos não possuem vias efetivas de eliminação de Cd pelo que qualquer acumulação excessiva no corpo deve ser considerada potencialmente tóxica.

#### 6.4.1.5. Caracterização da resposta da planta

Nas **Figuras 6.13 e 6.14** estão os resultados obtidos para os parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos oxidativos, parâmetros de avaliação da intensidade do stresse e os parâmetros que traduzem a defesa antioxidante. De seguida irá fazer-se a caracterização da resposta da planta por modalidade. Na **Figura 6.15** encontra-se uma representação esquemática de caracterização da resposta antioxidante da alface M4E.

#### Solos sem adição de corretivos (S)

Nas plantas expostas a 1,5 e 12 mg Cd kg<sup>-1</sup>, verifica-se que apesar de haver um ligeiro aumento, não se observam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entre plantas controlo e ambas as concentrações de Cd aplicadas. Por outro lado, existe um aumento do teor de MDA nas plantas contaminadas, comparativamente à amostra controlo, evidenciando a existência de danos oxidativos.

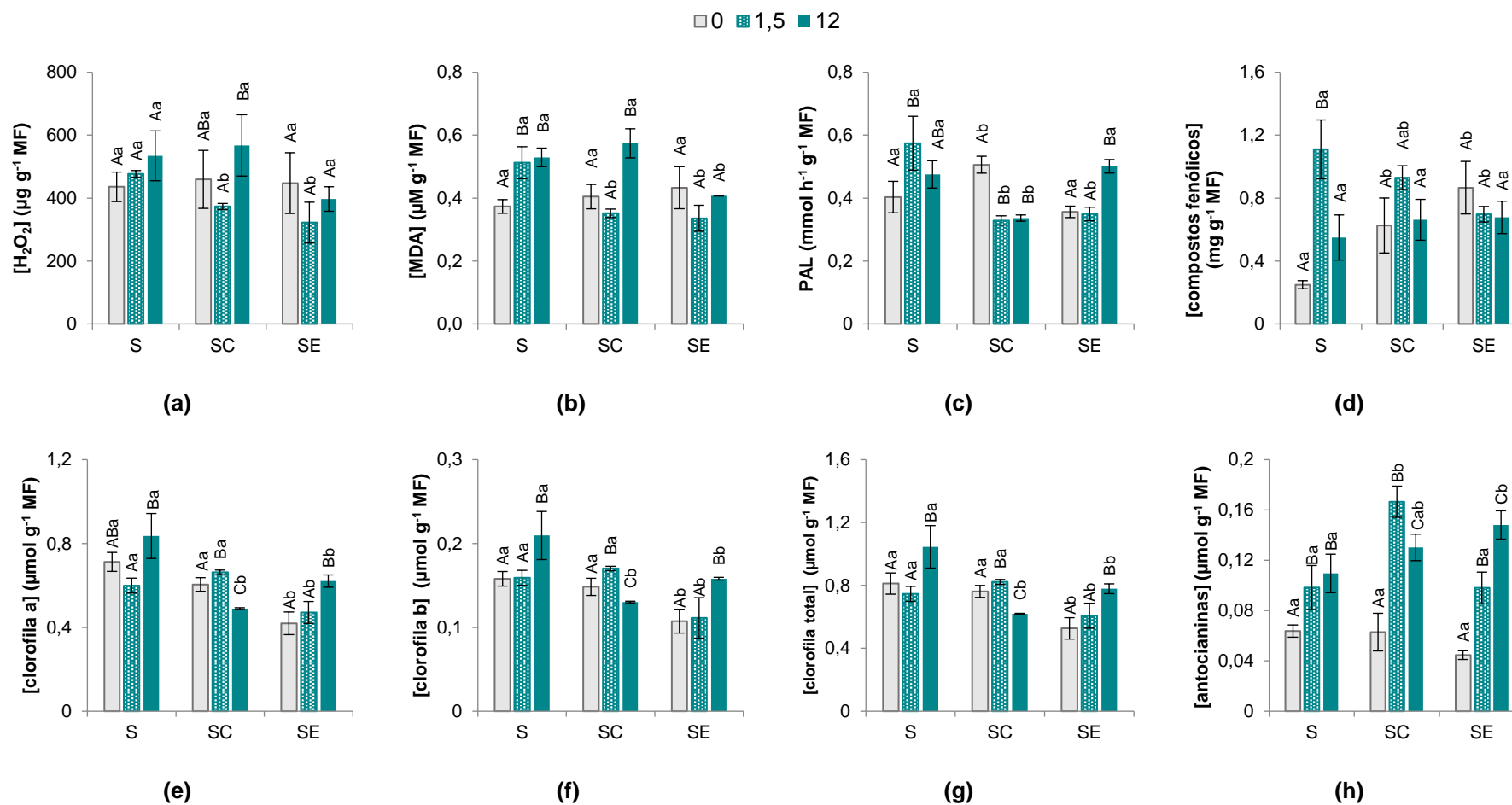
A destabilização da membrana celular devido ao stresse provocado pelo Cd é geralmente atribuída à peroxidação lipídica devido a um aumento da produção de ROS. No presente estudo, o aumento da peroxidação lipídica na presença de Cd, confirma que a toxicidade induzida pelo Cd provoca stresse oxidativo.

Apesar de o Cd promover alterações na atividade de enzimas que eliminam as ROS em várias plantas (**Capítulo V**), esta resposta da planta depende do tipo de planta, da parte da planta (raiz, folha, caule, etc) e do nível de radicais livres, que resultam do equilíbrio entre a sua produção e eliminação.

Nas plantas contaminadas com 1,5 mg Cd kg<sup>-1</sup> sem adição de corretivos, a atividade antioxidante aumenta significativamente, indicando que possivelmente está ativo o sistema antioxidante.

Relativamente aos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse é possível verificar que não existem diferenças significativas nos teores de clorofila a, b e total, comparativamente à amostra controlo, evidenciando que não existem danos nas moléculas de clorofila o que está concordante com os sintomas visíveis de toxicidade observados.

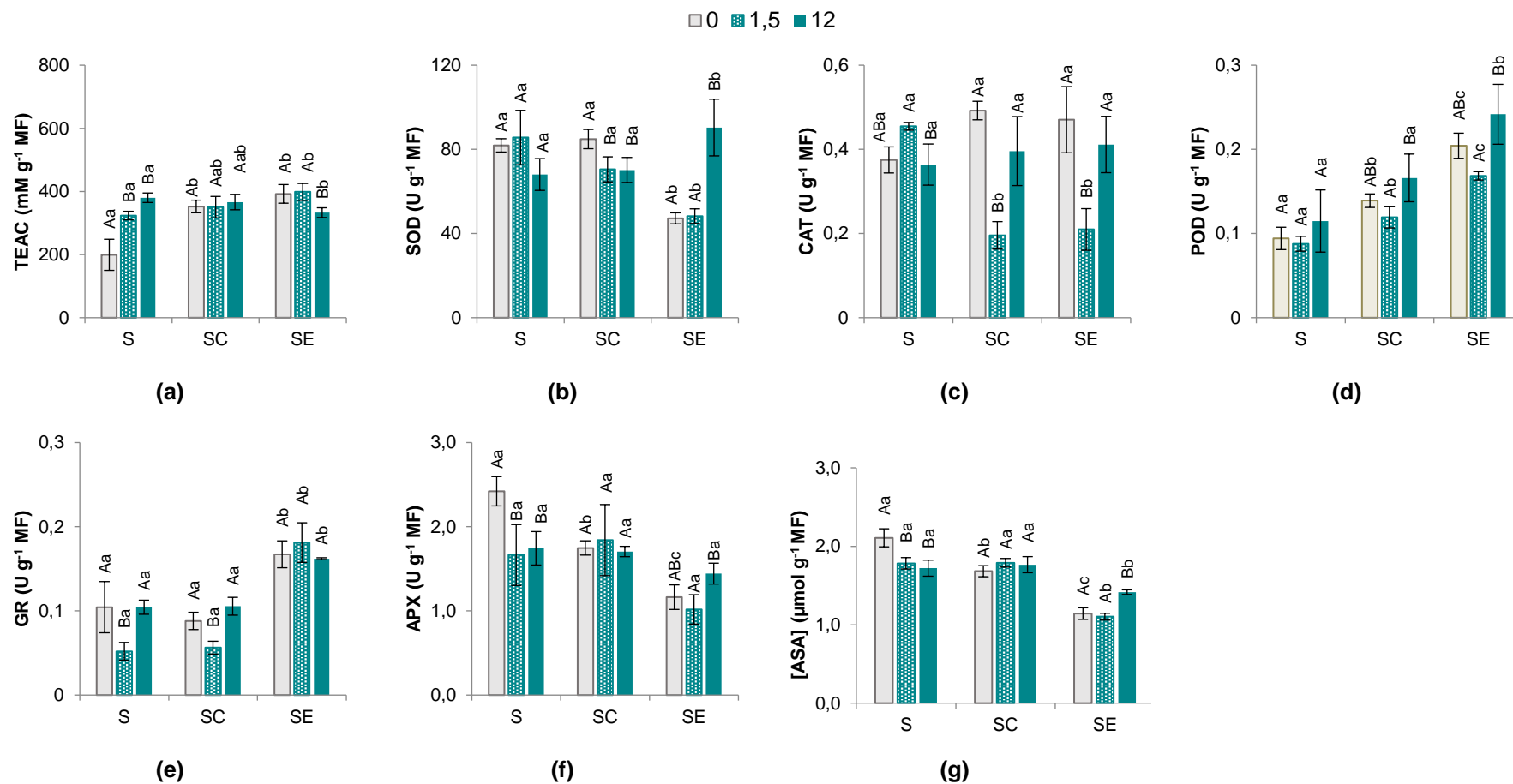




**Figura 6.13** – Parâmetros indicadores de stresse oxidativo (a) e danos nas membranas (b) e parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (c, d, e, f, g, h) na parte edível de plantas de alfafa M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 1,5 e 12  $mg\ Cd\ kg^{-1}$ , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

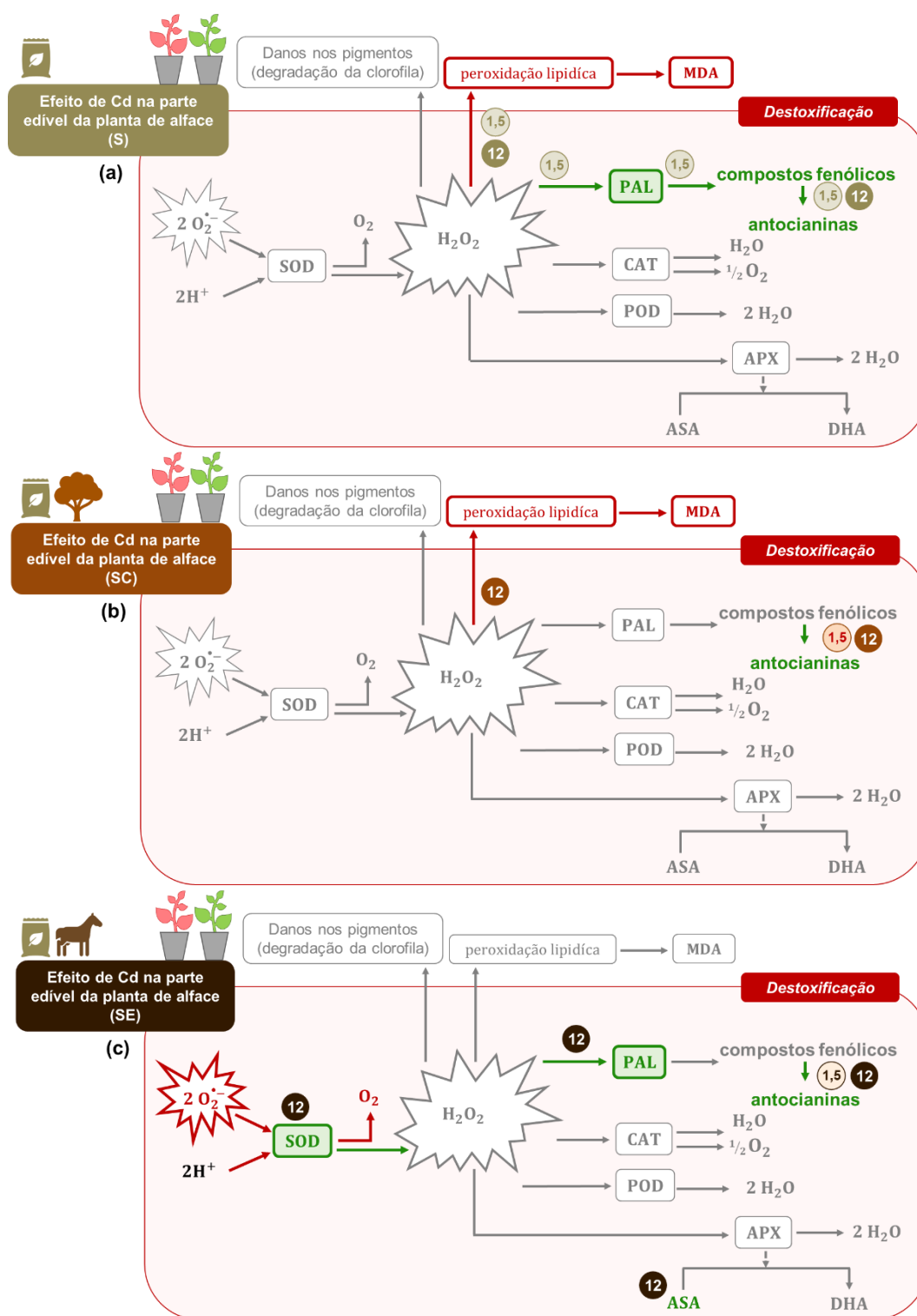
As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controle e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Cd aplicado ( $n=3$ ).





**Figura 6.14** – Atividade antioxidante total (a), enzimas antioxidantes (b,c,d,e,f) e concentração de ascorbato (g) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 1,5 e 12 mg Cd kg<sup>-1</sup>, com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controle e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Cd aplicado ( $n=3$ ).



**Figura 6.15** – Representação esquemática da resposta antioxidante de alface M4E contaminada com 1,5 e 12 mg Cd kg<sup>-1</sup> e sujeita a diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

A **verde** estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a **vermelho** os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a **azul** os compostos formados que não são prejudiciais.



Por outro lado, o teor de antocianinas, o teor de polifenóis e a atividade da PAL, apresentam a mesma tendência, um aumento significativo em plantas contaminadas, comparativamente às plantas controlo. Neste sentido, existe uma tendência crescente na atividade enzimática da PAL, que está relacionada com um aumento da produção de compostos fenólicos e de antocianinas que são fundamentais na eliminação das ROS, ou seja, por manter baixos os níveis de peróxido de hidrogénio. No entanto, esta resposta parece não ser suficiente para evitar a presença de danos oxidativos nas membranas, não evitando a peroxidação lipídica.

Não se observam diferenças significativas nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e POD e, inclusivamente, existe uma diminuição significativa nas atividades da GR e APX. Esta tendência é acompanhada pela diminuição no teor de ASA evidenciando que estas enzimas e metabolito antioxidantes não estão envolvidos nos mecanismos de defesa da planta, face a estas condições de stresse (**Figura 6.15-a**).

Em plantas contaminadas com 12 mg Cd kg<sup>-1</sup> sem adição de corretivos, há um aumento significativo na atividade antioxidante, indicando que existe um sistema antioxidante ativo.

Observa-se que existe um aumento significativo no teor de clorofila b e total em relação às plantas controlo, à exceção da clorofila a onde existe apenas um ligeiro aumento. O teor de antocianinas também aumenta de forma significativa, em relação, às plantas controlo. No entanto, não se observam diferenças significativas nos teores de compostos fenólicos nem na atividade da PAL, havendo apenas um ligeiro aumento. Nestas condições de ensaio, a presença de uma concentração mais elevada de Cd também leva à indução da produção de compostos antioxidantes, como as antocianinas.

Não existem diferenças significativas nas atividades enzimáticas da SOD, CAT, POD e GR. Para além disso, também se verifica uma diminuição na atividade da APX e ASA. Estes resultados indicam que estas enzimas e metabolito antioxidantes não apresentam um papel fundamental nos mecanismos de defesa, face a estas condições de stresse. O stresse induzido por esta concentração de Cd num solo sem adição de corretivos, durante este tempo de exposição, não foi suficiente para induzir uma resposta mais intensa na planta (**Figura 6.15-a**).

Nestas condições de ensaio, ao fim de 50 dias de exposição ao Cd, o stresse induzido em plantas que se desenvolveram em solos contaminados sem adição de corretivos (S) desencadeou uma resposta na planta focada maioritariamente na produção de antocianinas que eliminam as ROS, tal como observado por outros autores (Azevedo et al., 2012; Dai et



al., 2012). Segundo Younis et al. (2016) o aumento no teor de antocianinas durante um stresse induzido por Cd pode estar envolvido na tolerância das plantas de espinafre ao Cd, mas a diminuição nos teores de antocianinas com concentrações de Cd superiores indicam que as plantas conseguem tolerar o stresse provocado pelo Cd até certo limite.

No entanto, esta resposta parece não ser suficiente para evitar a presença de danos oxidativos nas membranas não evitando a peroxidação lipídica.

### **Solos com adição de cortiça (SC)**

Em todas as concentrações de Cd em estudo, não se observam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo ( $H_2O_2$ ) entre plantas controlo e ambas as concentrações de Cd aplicadas.

Nas plantas contaminadas com  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$  Cd com adição de cortiça, não existem diferenças significativas nos teores de MDA, evidenciando que não existem danos oxidativos nas plantas. Não existem diferenças significativas na atividade antioxidante total, refletindo que existe um baixo nível de atividade antioxidante nestas plantas.

Relativamente aos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, observa-se um aumento no teor de clorofila a, b e total em plantas contaminadas, comparativamente ao controlo. O teor de antocianinas também apresenta um aumento significativo comparativamente às plantas controlo, evidenciando que estes pigmentos são importantes na resposta da planta. Não se observam diferenças significativas nos teores de compostos fenólicos e existe uma tendência decrescente significativa na atividade enzimática da PAL.

Não existem diferenças significativas nos mecanismos enzimáticos antioxidantes POD e APX, existindo inclusivamente uma diminuição da atividade da SOD, CAT, e GR, e metabolito antioxidante (ASA). Isto evidencia que estes parâmetros não são eficientes na resposta da planta (**Figura 6.15-b**).

Nas plantas contaminadas com  $12 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  com adição de cortiça, existe um aumento do teor de MDA, comparativamente à amostra controlo, evidenciando a existência de danos oxidativos. Com a exposição a esta concentração superior de cádmio, continua a não haver diferenças significativas na atividade antioxidante total.

Relativamente aos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, observa-se uma diminuição no teor de clorofila a, b e total em plantas contaminadas comparativamente ao



controle, o que não se verifica visualmente pois não se observa o aparecimento de cloroses. O comportamento para o teor de antocianinas, polifenóis e atividade da PAL, foi o mesmo verificado para as plantas contaminadas com  $1,5 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ , evidenciando que as antocianinas estão a exercer o seu efeito antioxidante.

Não se observam diferenças significativas nos mecanismos enzimáticos nem não-enzimáticos, evidenciando que estes mecanismos não estão ativos na resposta da planta face a estas condições experimentais (**Figura 6.15-b**).

O stresse induzido em plantas que se desenvolveram em solos contaminados com a adição de cortiça (SC), também não foi suficiente para induzir uma resposta mais intensa na planta. Os resultados obtidos para a exposição a  $1,5$  e  $12 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  em solos, onde foi adicionada cortiça, indicam que as plantas podem tolerar o stresse induzido pelo cádmio através do aumento da síntese de antocianinas. No entanto, este aumento não é suficiente de modo a evitar a peroxidação lipídica, no caso das plantas contaminadas com  $12 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ .

#### **Solos com adição de estrume de cavalo (SE)**

Não se observam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nem danos oxidativos entre as plantas controle e as plantas expostas a diferentes concentrações de Cd.

Nas plantas contaminadas com  $1,5 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  com adição de estrume, não se observam diferenças significativas na atividade antioxidante total, indicando que o nível antioxidante nestas plantas é baixo.

Não se observam diferenças significativas nos teores de clorofila a, b e total, compostos fenólicos e atividade da PAL. Apenas se observa um aumento nos teores de antocianinas, comparativamente à amostra controle, evidenciando que estes pigmentos são fundamentais na resposta da planta face ao stresse induzido por estas condições experimentais.

Na defesa antioxidante, também não se observam diferenças significativas na atividade antioxidante total, no teor de ASA, nem nas atividades enzimáticas de todas as enzimas antioxidantes, à exceção da CAT onde se observa uma diminuição da sua atividade (**Figura 6.15-c**).

Nas plantas contaminadas com  $12 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  com adição de estrume, a atividade antioxidante total também diminui significativamente em relação às plantas controle.



No teor de clorofila a, b e total existe um aumento significativo em plantas contaminadas comparativamente às plantas controle. O aumento significativo no teor de antocianinas é acompanhado por um aumento na atividade da PAL, possivelmente porque esta enzima está a ser utilizada na produção de antocianinas que poderão ser utilizadas na eliminação das ROS. Na concentração de compostos fenólicos não se observaram diferenças significativas, comparativamente ao controle.

O teor do metabolito antioxidante não-enzimático estudado, o ascorbato, aumenta significativamente. Este aumento da concentração de ASA pode indicar um papel crucial deste metabolito nestas condições de ensaio. A SOD é a única enzima em que existe um aumento significativo da sua atividade, comparativamente ao controle, evidenciando que possivelmente esta enzima estará a converter o  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  (**Figura 6.15-c**).

Nas plantas que se desenvolveram em solos com a adição de estrume de cavalo, já não ocorre a peroxidação lipídica, evidenciando que a resposta da planta consegue evitar o aparecimento de danos oxidativos em ambas as concentrações de Cd. Continua a existir a produção de antocianinas como forma de tolerar a presença de Cd. Por outro lado, uma concentração mais elevada, para além de ativar a produção destes pigmentos antioxidantes, também ativa a SOD e o metabolito ASA, de modo a manter os níveis de ROS controlados.

Em suma, no caso da resposta da planta face ao stresse induzido pela menor concentração menor de Cd ( $1,5 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ) apenas existem danos oxidativos na modalidade S. Nas modalidades SC e SE não existem danos oxidativos nas plantas, sendo as antocianinas responsáveis por manter os níveis de stresse baixos. Isto indica que a presença de corretivos, permite acumular uma quantidade menor de Cd que tem efeito direto na resposta da planta.

A adição de uma concentração mais elevada de Cd aos solos ( $12 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ) resulta no aparecimento de danos oxidativos nas modalidades S e SC. Em ambas as modalidades, as antocianinas são a principal forma de defesa da planta identificada neste estudo. No caso da modalidade SE existe a ativação da SOD e produção de ASA, para além do aumento do teor de antocianinas. É na modalidade SE que as plantas acumulam uma menor quantidade de Cd e, por isso, conseguem evitar o aparecimento de danos oxidativos, o que já não acontece na modalidade SC ( $12 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ) e S ( $1,5$  e  $12 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ).



#### 6.4.1.6. Avaliação da toxicidade induzida por Cd em solo

Na **Tabela 6.16** encontram-se os resultados para o Índice de Tolerância (IT), da parte edível das plantas de alface contaminadas com cádmio que se desenvolveram em solo, com e sem adição de corretivos. Estes resultados permitem caracterizar a tolerância das plantas de alface M4E face à presença de diferentes corretivos.

**Tabela 6.16** – Índice de tolerância da parte edível, de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Cd e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

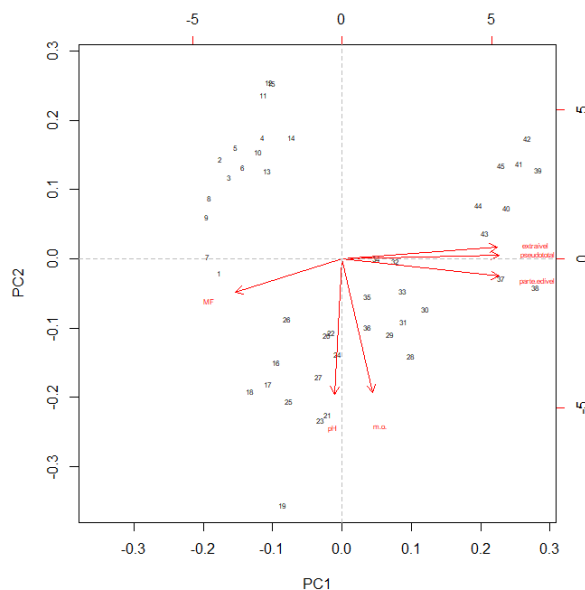
Modalidade	IT (%)				
	[Cd] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	1,5	3	6	12
S	100	98,59	99,10	77,42	73,36
SC	100	111,61	104,73	85,23	86,21
SE	100	97,04	96,52	82,85	83,09

As plantas expostas a 6 e 12 mg Cd kg<sup>-1</sup>, são as que apresentam valores de IT menores. Os resultados obtidos anteriormente para a massa fresca estão concordantes com os observados para o índice de tolerância. Neste índice verifica-se a existência de uma ligeira diminuição, mas que nunca é inferior a 50 %, comparativamente ao controlo. Estes valores são menores para a modalidade S, comparativamente às modalidades SC e SE, ou seja, as plantas que se desenvolveram em solos sem adição de corretivos apresentam uma menor tolerância ao Cd.

Para se avaliar a relação entre as variáveis estudadas realizou-se uma análise em componentes principais (ACP) (**Figura 6.16**). Nesta análise considerou-se 6 variáveis: parte edível (corresponde à concentração de Cd na parte edível, mg kg<sup>-1</sup> MS), pseudototal (corresponde à concentração de Cd na fração pseudototal, mg kg<sup>-1</sup> MS), extraível (corresponde à concentração de Cd na fração extraível, mg kg<sup>-1</sup> MS), pH, m.o. (matéria orgânica, %) e MF (massa fresca, g).

Através da ACP é possível verificar que as variáveis que correspondem à concentração de Cd presente na fração pseudototal, extraível e na parte edível estão muito bem correlacionadas, o que faz sentido, uma vez que quanto maior a concentração de Cd presente no solo (pseudototal e extraível), maior será a quantidade deste elemento presente na parte edível da alface.





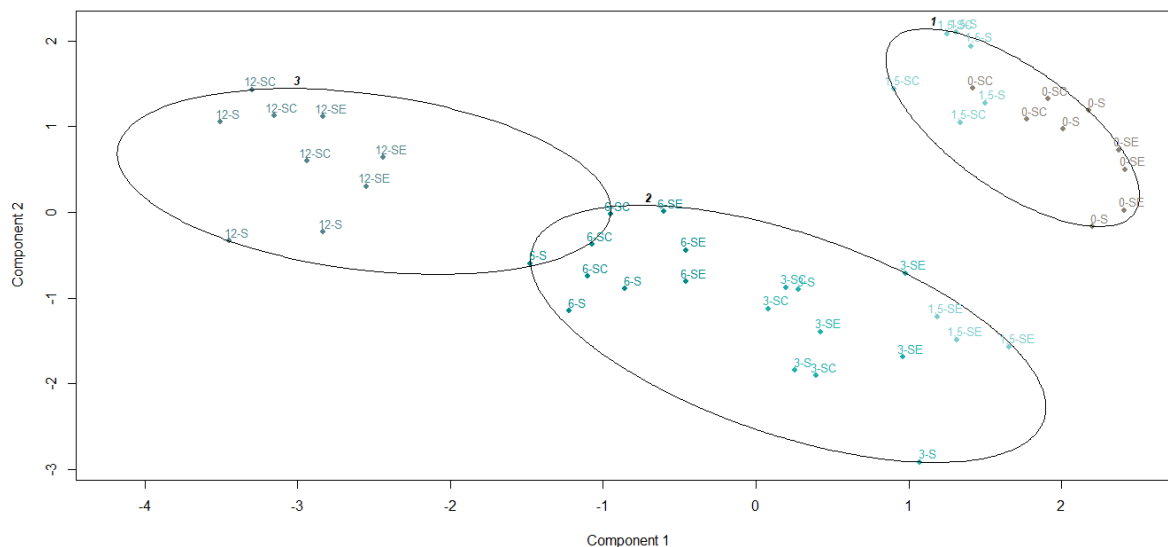
**Figura 6.16** – Análise em componentes principais realizada para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Cd ( $n=3$ ), considerando 6 variáveis: *parte edível*, *pseudototal*, *extraível*, *pH*, *m.o.* e *MF*.

As variáveis estão representadas a **vermelho**: vetores paralelos, significa que as variáveis estão bem correlacionadas; vetores com o cosseno do ângulo superior a  $90^\circ$  indicam uma má correlação.

Como é previsível, a variável massa fresca não apresenta uma boa correlação e tem um comportamento oposto ao observado pelas três variáveis anteriores. Isto vem comprovar o que já foi descrito anteriormente, que a acumulação de Cd na parte edível e presente no solo, origina uma ligeira diminuição da biomassa da planta. Por outro lado, é possível também verificar que as variáveis pH e matéria orgânica, não estão diretamente correlacionadas com as restantes variáveis em estudo. A ACP é explicada num total de 79,96 % pela relação entre a componente principal 1 e a componente principal 2 (PC1 vs PC2).

Para se avaliar a toxicidade dos EPTs estudados realizou-se uma análise classificatória com o método de partição (PAM) que permitisse separar os indivíduos por classes (**Figura 6.17**), considerando-se as 6 variáveis referidas anteriormente.

Nesta análise de agrupamento em classes verifica-se que existe uma classe muito bem individualizada com os indivíduos controlo de todas as modalidades e os indivíduos contaminados com  $1,5 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  das modalidades S e SC, evidenciando que estes indivíduos são muito semelhantes entre si.



**Figura 6.17** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Cd ( $n=3$ ). Estas duas componentes explicam 79,96 % da variabilidade.

Os indivíduos estão apresentados com base na concentração de Cd (0, 1,5, 3, 6 e 12 mg Cd kg<sup>-1</sup>) e na modalidade aplicada (S- sem adição de corretivos; SC- adição de cortiça; SE- adição de estrume).

As outras duas classes apresentam sobreposição. No entanto, é possível distinguir que numa classe estão os indivíduos contaminados com as concentrações mais baixas de Cd (1,5 (SE), 3 e 6 mg Cd kg<sup>-1</sup>) e noutra os indivíduos mais contaminados (6 (S, SC) e 12 mg Cd kg<sup>-1</sup>). Outro aspeto que também se verifica é que nesta última classe os indivíduos contaminados com a concentração mais elevada de Cd apresentam uma nuvem de pontos mais próxima entre si, evidenciando que são diferentes de todos os outros indivíduos.

### *Conclusões intercalares*

A adição de corretivos orgânicos, como a cortiça e o estrume, não teve influência no teor de Cd extraível presente no solo. A presença destes corretivos também não teve influência nos valores de pH dos solos, mantendo-se perto da neutralidade. No entanto, a sua presença origina um aumento nos teores de matéria orgânica mas que não tem um efeito significativo na diminuição do teor de Cd extraível.

A alface M4E acumula uma elevada quantidade de Cd sem exibir nenhum sintoma de toxicidade para nenhuma concentração de cádmio aplicada. Isto significa que, provavelmente, a planta consegue suportar concentrações mais elevadas de Cd no solo até serem observados efeitos adversos.



Nestas condições de ensaio, apenas se verifica uma ligeira diminuição da biomassa e do índice de tolerância nas plantas mais contaminadas (6 e 12 mg Cd kg<sup>-1</sup>) para todas as modalidades (S, SC e SE), mas que não é significativa em relação às plantas controlo. Isto permite concluir que as plantas que se desenvolveram em solos sem adição de corretivos (S) apresentam uma menor tolerância ao Cd, ou seja, a presença de corretivos permite diminuir o teor de Cd acumulado, aumentando ligeiramente a tolerância da alface.

Nas plantas de alface que se desenvolveram nas modalidades SC e SE, é possível verificar que ocorre uma diminuição acentuada da acumulação de Cd na planta, comparativamente às plantas que cresceram em solos sem adição de corretivos (S). Nas modalidades SC e SE existe uma diminuição ligeira do FT o que significa que a presença destes corretivos diminui a capacidade da planta em transferir o Cd presente no solo para a parte aérea da planta.

Se considerarmos o teor de Cd presente na parte edível de plantas expostas a cádmio é possível verificar que ultrapassa, em qualquer dos casos, o valor permitido por lei de 0,2 mg Cd kg<sup>-1</sup> MF (Comissão Regulation (EU) 488/2014) para qualquer uma das modalidades em estudo (S, SC e SE). A exposição de plantas de alface a uma concentração inferior (1,5 mg Cd kg<sup>-1</sup>) ao valor limite de referência da concentração de metais pesados nos solos neutros (3,0 mg Cd kg<sup>-1</sup>), também resulta numa acumulação significativa e superior ao valor permitido por lei deste elemento em hortícolas de folha. Para além disso, no presente estudo todas as plantas contaminadas com cádmio apresentam valores de IDE superiores à dose de referência referida no presente trabalho.

Pode-se concluir que é promissora a remediação de solos por aplicação dos corretivos testados neste trabalho (cortiça e estrume de cavalo), que são relativamente abundantes em Portugal, dado que contribui para reduzir a acumulação de cádmio pela alface. Contudo, os resultados obtidos indicam que as quantidades de corretivos não foram suficientes para evitar riscos uma vez que os teores de Cd acumulados na parte edível da alface são superiores aos legislados. Como as plantas não apresentam sintomas visíveis de toxicidade e acumulam uma quantidade significativa de cádmio na parte edível, continua a existir uma preocupação relativamente à contaminação da cadeia alimentar.



## 6.4.2. Crómio

### 6.4.2.1. Caracterização do solo artificialmente contaminado com Cr

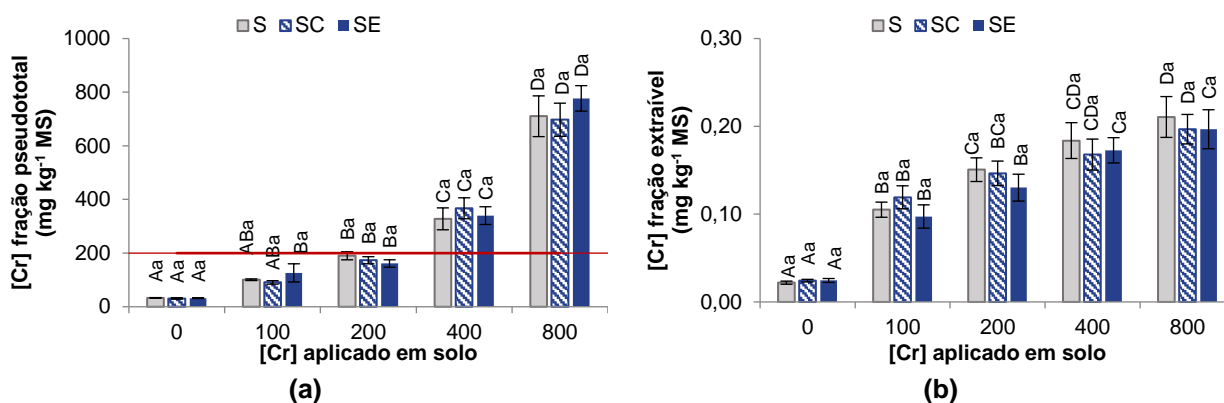
Na **Figura 6.18-a** apresentam-se as medições dos valores pseudototais de Cr no solo que são bastante próximos dos valores nominais (a quantidade teoricamente adicionada). As frações extraíveis, considerando a maior contaminação de crómio, correspondem a 0,030, 0,028 e 0,025 %, do total presente no solo S, SC e SE, respetivamente (**Figura 6.18-b**).

O Decreto-lei (n.º 276/2009) aplica-se quando se pretende adicionar lamas de depuração ao solo, sendo o valor de referência de Cr em solos neutros de 200 mg Cr kg<sup>-1</sup>. Se considerarmos solos em que se pretende aplicar matéria fertilizante, uma legislação mais recente (Decreto-Lei, n.º 103/2015 ) indica o valor de 60 mg Cr kg<sup>-1</sup>. A legislação canadiana define o valor de 160 mg kg<sup>-1</sup> para uso agrícola e a legislação holandesa refere o valor referência de 100 mg kg<sup>-1</sup> e o valor de intervenção de 380 mg kg<sup>-1</sup> (Leitão et al., 2016b).

A partir de 200 mg Cr kg<sup>-1</sup> presente no solo, existe uma tendência para diminuir a quantidade de Cr extraível pela planta, nas modalidades SC e SE. Apesar de não haver diferenças significativas, estes resultados indicam que a presença dos corretivos poderá vir a ter interferência na disponibilidade de crómio no solo. Normalmente, a adição de corretivos orgânicos ao solo leva à imobilização de Cr através de reações de adsorção, levando ao aumento da retenção de crómio no solo que não está disponível para a planta absorver.

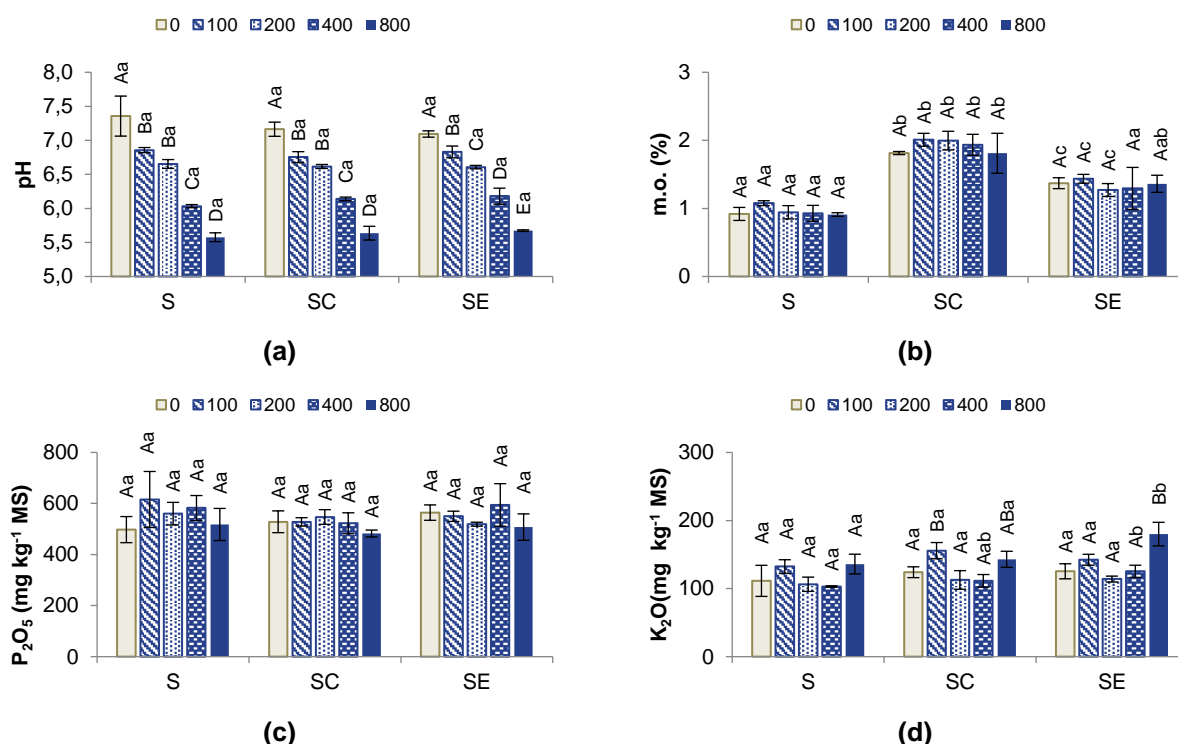
Os resultados obtidos para o pH, matéria orgânica, fósforo extraível e potássio extraível encontram-se representados na **Figura 6.19**.

Existe claramente uma diminuição muito significativa dos valores de pH, com o aumento da concentração de Cr presente, havendo diferenças significativas a partir de 100 mg Cr kg<sup>-1</sup> entre os solos contaminados e os solos controlo, para todas as modalidades utilizadas (S, SC e SE) (**Figura 6.19-a**). A presença de Cr no solo leva a uma diminuição do pH de solos não contaminados (S:7,36±0,29; SC:7,16±0,10; SE:7,09±0,05), comparativamente aos solos contaminados com 800 mg Cr kg<sup>-1</sup> (S:5,58±0,06; SC:5,64±0,10; SE:5,67±0,01). Tal como referido anteriormente, os solos ácidos aumentam a disponibilidade do EPT na solução do solo para poder ser absorvido pela planta.



**Figura 6.18** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Cr e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) concentração pseudototal de Cr (mg kg<sup>-1</sup> MS) e (b) concentração de Cr na fração extraível (mg kg<sup>-1</sup> MS).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Cr aplicado ( $n=3$ ). A linha **a vermelha** representa o valor máximo de Cr que pode estar presente nos solos (200 mg Cr kg<sup>-1</sup>).



**Figura 6.19** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Cr e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) pH, (b) matéria orgânica (%), (c) fósforo extraível (mg kg<sup>-1</sup> MS) e (d) potássio extraível (mg kg<sup>-1</sup> MS).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Cr aplicado ( $n=3$ ).

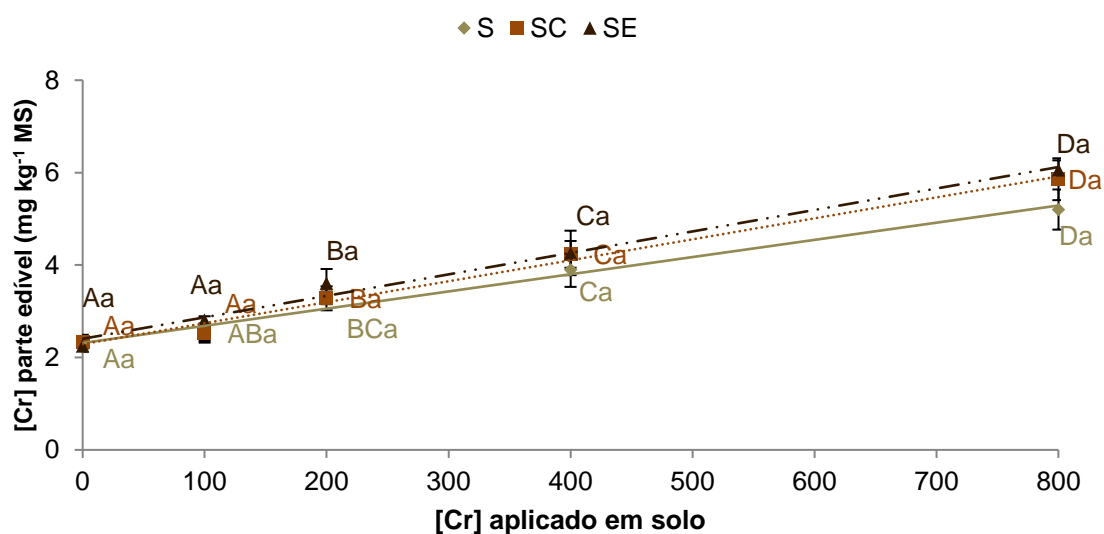


Há um aumento significativo do teor de matéria orgânica nas modalidades SC e SE, comparativamente à modalidade S. No entanto, não se verificam diferenças significativas entre solos não contaminados e contaminados para todas as modalidades em estudo (**Figura 6.19-b**). Os corretivos orgânicos possuem quantidades de m.o. elevadas o que minimiza a biodisponibilidade de crômio através da sua adsorção ou formação de complexos estáveis.

Os resultados obtidos para o fósforo e potássio extraível não apresentam diferenças significativas entre o controlo e os solos contaminados, bem como entre as modalidades aplicadas (**Figura 6.19-c, 6.19-d**). Os valores de  $K_2O$  encontram-se elevados (100-200) e os de  $P_2O_5$  muito elevados ( $> 200$ ).

#### 6.4.2.2. Caracterização da acumulação de Cr em alface

A acumulação de Cr, na parte edível da alface M4E, para as diferentes modalidades em estudo encontra-se apresentada na **Figura 6.20**.



dias	<i>m</i>	<i>b</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	Linha
S	0,0037	2,313	0,9826	—
SC	0,0045	2,288	0,9906	.....
SE	0,0046	2,404	0,9877	- - -

**Figura 6.20** – Concentração de Cr ( $mg\ kg^{-1}\ MS$ ) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controlo), 100, 200, 400 e 800  $mg\ Cr\ kg^{-1}$ , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Cr aplicado ( $n=3$ ).



A acumulação de Cr apresenta um comportamento linear e, nestas condições de ensaio, verifica-se que existe um ajuste razoável ao modelo linear, tal como indicam os valores de  $R^2 > 0,98$ . Este aumento linear significa que existe uma proporcionalidade direta entre os valores de Cr absorvidos e os valores de Cr presentes no solo.

Este comportamento traduz-se num aumento gradual e significativo do teor de Cr acumulado na parte edível das plantas contaminadas, comparativamente às plantas controlo. Esta acumulação é crescente existindo diferenças significativas entre plantas expostas a 400 e 800 mg Cr kg<sup>-1</sup> para todas as modalidades, estando longe de atingir valores de saturação.

Outros autores também obtiveram resultados da acumulação de Cr em plantas alimentares em estudos realizados em solos contaminados com crómio. Adamo et al. (2014) também verificaram que as concentrações de Cr na parte edível de alfaces cultivadas em solos contaminados com este elemento (104,2±122,0 mg Cr kg<sup>-1</sup> solo) próximos de zonas com indústrias de curtumes variaram entre 0,02-0,26 mg Cr kg<sup>-1</sup>. Por outro lado, Liao et al. (2011) observaram que a alface, presente em solos contaminados com 90,0–6207,6 mg Cr kg<sup>-1</sup> solo, acumulou uma quantidade superior de Cr, 11,8 ± 4,5 mg Cr kg<sup>-1</sup>, na parte edível. Os resultados obtidos por Wang et al. (2011b) sugeriram que os teores de Cr presentes em vários hortícolas, nomeadamente na alface (6,3-18,8 mg Cr kg<sup>-1</sup>), excederam o valor máximo permissível na China considerado pelos autores (0,5 mg Cr kg<sup>-1</sup>).

Regra geral, os corretivos orgânicos diminuem a disponibilidade do crómio. Ao contrário do que seria de esperar, as plantas que se desenvolveram em solos sem adição de corretivos, acumularam uma quantidade ligeiramente inferior de Cr (5,20±0,43 mg Cr kg<sup>-1</sup>), em relação às modalidades SC (5,86±0,45 mg Cr kg<sup>-1</sup>) e SE (6,06±0,21 mg Cr kg<sup>-1</sup>), apesar de não existirem diferenças significativas entre modalidades. A adição de cortiça e estrume provoca um aumento na absorção de Cr de 12,6 e 16,5 %, em comparação com a modalidade sem corretivo, respetivamente.

Existem diversos estudos sobre a aplicação de corretivos orgânicos a solos contaminados com Cr, nomeadamente estrume, verificando-se de um modo geral uma diminuição da disponibilidade deste elemento para as plantas (Castro et al., 2009; Karak et al., 2014; Malandrino et al., 2011; Singh et al., 2007). Em relação aos resíduos de cortiça, não existem estudos efetuados sobre a sua capacidade de adsorção de metais no solo.

Se considerarmos o teor de Cr presente na parte edível de plantas expostas a 100 mg kg<sup>-1</sup> Cr (2,23±0,10 mg Cr kg<sup>-1</sup> MS (S), 2,34±0,15 mg Cr kg<sup>-1</sup> MS (SC) e 2,25±0,03 mg Cr kg<sup>-1</sup> MS (SE)) e plantas contaminadas com 800 mg kg<sup>-1</sup> Cr (5,20±0,43 mg Cr kg<sup>-1</sup> MS (S),





5,86±0,45 mg Cr kg<sup>-1</sup> MS (SC) e 6,06±0,21 mg Cr kg<sup>-1</sup> MS (SE)), é possível verificar que ultrapassa, em qualquer um dos casos, os valores de Cr em hortícolas considerados não contaminados, 0,2-1,0 mg Cr kg<sup>-1</sup> MS (Nagajyoti et al., 2010), para ambas as modalidades em estudo (S, SC e SE).

Os dados obtidos para o fator de transferência do solo que permitem verificar a capacidade que as plantas de alface têm em transferir o Cr presente no solo para a sua parte edível estão apresentados na **Tabela 6.17**.

**Tabela 6.17** – Fator de transferência do solo para a alface M4E que se desenvolveu em solo, sujeita a diferentes concentrações de Cr e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

Modalidade	Fator de transferência (FT)				
	[Cr] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	100	200	400	800
S	0,007	0,025	0,017	0,012	0,007
SC	0,005	0,028	0,019	0,012	0,008
SE	0,007	0,022	0,022	0,013	0,008

À medida que a concentração de Cr no solo aumenta, o FT tende a diminuir ligeiramente em todas as modalidades (S, SC e SE), não existindo grandes variações entre solos sem adição de corretivos e com adição de corretivos.

Os valores obtidos de FT para o Cr, são muito mais baixos que os apresentados para o Cd (**Tabela 6.13**). Isto indica que o crómio, presente no solo, é um elemento mais difícil de ser transferido para a parte aérea da planta, tal como verificado no **Capítulo IV**, sendo preferencialmente acumulado nas raízes das plantas de alface. Isto está de acordo com o facto de os teores de Cr acumulados na parte edível das plantas de alface serem bastante inferiores aos obtidos para os teores de Cd, apesar das concentrações de Cd utilizadas serem muito mais baixas (**Figura 6.11**).

A sequestração do Cr nas raízes deve-se provavelmente à formação de compostos insolúveis de Cr dentro das plantas. Alguns autores referiram o aumento da sequestração de Cr nos vacúolos das células das raízes, limitando o seu efeito potencialmente tóxico, podendo ser um mecanismo natural de defesa da planta (Singh et al., 2013). Tal como referido em Shahid et al. (2017b) a transferência do Cr da raiz para a parte aérea depende da forma química de



Cr presente. A translocação limitada de Cr para a parte superior da planta pode também dever-se ao facto de o  $\text{Cr}^{3+}$  ter maior propensão para se ligar às paredes celulares das raízes.

Adamo et al. (2014) também obtiveram valores de FT baixos em alface (0,003) para uma concentração de  $104,2 \pm 122,0 \text{ mg Cr kg}^{-1}$  solo. Os resultados obtidos por Malandrino et al. (2011) indicaram que alface e espinafre que cresceram em solos contaminados sem adição de corretivos apresentaram um FT superior aos vegetais que cresceram com adição de corretivos, sendo todos inferiores a 0,5. Liao et al. (2011) observaram que os valores de FT seguiram a seguinte ordem decrescente: couve-chinesa > alface > aipo, tendo obtido valores de  $\text{FT} < 0,04$  para todas as plantas. Karak et al. (2014) também obtiveram um  $\text{FT} < 1$ , indicando que as plantas de chá não apresentaram um potencial significativo em transferir o crómio presente no solo.

#### 6.4.2.3. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade

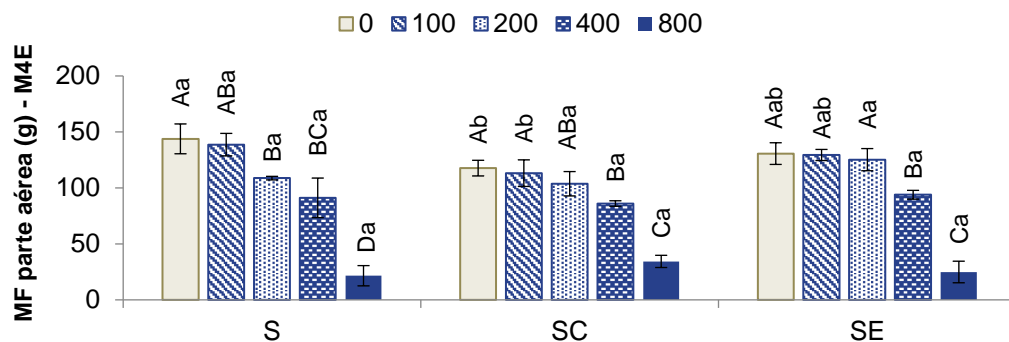
Os resultados obtidos para a massa fresca da parte edível, bem como os sintomas visíveis de toxicidade observados na alface M4E para cada modalidade e com diferentes concentrações de Cr em solo encontram-se apresentados na **Figura 6.21**.

Nas plantas contaminadas com crómio observam-se indícios de toxicidade, nomeadamente uma diminuição evidente no tamanho da planta, bem como o aparecimento de uma coloração avermelhada nas folhas das plantas de alface contaminadas com  $800 \text{ mg Cr kg}^{-1}$ . Neste caso de contaminação, as plantas que se desenvolveram em solos contaminados com crómio, sem adição de corretivos orgânicos (S), manifestaram-se visualmente mais afetadas, ou seja, com menor tamanho e com coloração avermelhada mais intensa (**Figura 6.21-a**).

Para concentrações mais baixas ( $100\text{-}400 \text{ mg Cr kg}^{-1}$ ), as plantas de alface não apresentaram sintomas visíveis de toxicidade, apesar da acumulação de Cr. A ausência de sintomas visíveis de toxicidade, deve-se ao facto de o Cr não ser muito mobilizado para a parte aérea da planta e, por isso, poder ficar retido preferencialmente na raiz, por adsorção ou fixação às paredes celulares, ou ligados a exsudados extracelulares, formando quelatos e sendo armazenados no vacúolo (Rascio e Navari-Izzo, 2011), ou por outro lado poderão existir mecanismos de destoxificação eficientes na parte aérea, que vão ser discutidos posteriormente.



(a)



(b)

**Figura 6.21** – Massa fresca da parte edível (a) e o registo fotográfico (b) de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo contaminado com Cr e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Cr aplicado ( $n=3$ ).



Existe uma diminuição significativa da massa fresca da parte edível, comparativamente ao controlo, a partir de 200 mg Cr kg<sup>-1</sup> nas modalidades S e SC, e a partir de 400 mg Cr kg<sup>-1</sup> para SE. A presença de 800 mg Cr kg<sup>-1</sup> provoca uma diminuição muito evidente na massa fresca, em relação às plantas controlo, não existindo diferenças significativas entre plantas sem adição de corretivos (S) e com adição de corretivos (SC, SE) (**Figura 6.21-b**). Os resultados obtidos para a massa fresca da parte edível estão de acordo com os obtidos visualmente, neste caso mais grave de contaminação. Os valores percentuais de diminuição da biomassa das plantas contaminadas com a maior concentração de crómio, comparativamente às plantas controlo, correspondem a 85,0, 70,8 e 80,9 %, para as modalidades S, SC e SE, respetivamente.

Num estudo realizado por Khan et al. (2008a), as plantas de alface que acumularam Cr na sua parte edível (3,4-4,1mg Cr kg<sup>-1</sup>), também apresentaram uma biomassa menor comparativamente às plantas controlo. Num estudo desenvolvido por Diwan et al. (2010) onde se utilizaram concentrações de Cr muito semelhantes ao presente estudo, observou-se também que a contaminação com 100, 200, 300 e 400 mg Cr kg<sup>-1</sup> solo não afetou significativamente a biomassa de plantas de *Brassica juncea*, esse efeito apenas foi significativo para o nível mais elevado de tratamento (800 mg Cr kg<sup>-1</sup>).

Segundo Shahid et al. (2017b) o crómio induz a diminuição do desenvolvimento, crescimento e rendimento da planta devido à combinação de vários fatores como a diminuição da absorção de água e nutrientes, redução de divisão celular, desequilíbrio na absorção e translocação de nutrientes, a ineficiência da planta em selecionar os elementos que absorve, aumento da produção de ROS e o consequente aparecimento de stresse oxidativo, substituição de elementos essenciais em moléculas ou ligandos chave, e danos oxidativos em locais sensíveis da planta, como as mitocôndrias, pigmentos, lípidos, entre outros.

#### 6.4.2.4. Avaliação do risco associado à ingestão de Cr

Na **Tabela 6.18** estão os resultados obtidos para a ingestão diária estimada de Cr através do consumo de alface contaminada e na **Tabela 6.19** estão os valores dos parâmetros de avaliação do risco de Cr na saúde dos seres humanos.



**Tabela 6.18** – Ingestão diária estimada, da parte edível de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Cr e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

Modalidade	IDE (mg dia <sup>-1</sup> )*				
	[Cr] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	100	200	400	800
S	0,0111	0,0127	0,0164	0,0195	0,0260
SC	0,0117	0,0126	0,0164	0,0212	0,0293
SE	0,0112	0,0141	0,0180	0,0213	0,0303

\*considerando o valor médio de ingestão média diária de alface de 22,5 g dia<sup>-1</sup> para adultos (WHO, 2003).

**Tabela 6.19** – Parâmetros de avaliação do risco associado à exposição ao Cr para a saúde do ser humano.

Parâmetros de avaliação do risco	Valores referência obtidos para o Cr	Referências Bibliográficas
UL	1 mg dia <sup>-1</sup>	(EFSA, 2014b)
TDI	300 µg Cr <sup>3+</sup> kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	(EFSA, 2014b)
RfD	1,5 mg Cr <sup>3+</sup> kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	(ATSDR, 2012)
MRL	0,0001 mg Cr <sup>3+</sup> m <sup>-3</sup>	(ATSDR, 2012)
RDI	120 µg dia <sup>-1</sup>	(ATSDR, 2012)

- UL (do inglês, *Tolerable Upper Intake Level*) – concentração máxima sem evidência de efeitos adversos associados à ingestão suplementar de substância até esta dose ou o nível máximo de ingestão tolerável.

- TDI – (do inglês, *Tolerable Daily Intake*) - ingestão diária tolerável de uma substância potencialmente nociva ou contaminante de alimentos que pode ser ingerida ao longo da vida sem risco de efeitos adversos para a saúde.

- RfD - dose de referência ou dose oral máxima aceitável de uma substância tóxica (neste caso, para sais insolúveis de Cr<sup>3+</sup>), que provavelmente não terá risco significativo de efeitos nocivos durante a vida.

- MRL - nível mínimo de risco, devido à exposição crônica por via oral, sem haver risco de efeitos adversos para a saúde

- RDI (do inglês, *Recommended Daily Intake*) – ingestão diária recomendada para a substância.

A ingestão média diária de alface é de 22,5 g dia<sup>-1</sup> para adultos (WHO, 2003) e considera-se um teor médio de humidade nas plantas de alface de 95,5 %. No presente estudo, a ingestão diária de crómio estimada através de alface cultivada em solos contaminados com Cr varia entre 0,0260 e 0,0303 mg Cr dia<sup>-1</sup>, considerando o caso mais problemático de contaminação (800 mg Cr kg<sup>-1</sup>). Para o nível de contaminação mais baixo (100 mg Cr kg<sup>-1</sup>) estes valores variam entre 0,0126 e 0,0141 mg dia<sup>-1</sup>.

De acordo com os dados obtidos, considerando um homem adulto de 70 kg, a ingestão diária de Cr estimada varia entre 0,37-0,43 µg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (considerando o caso mais grave de



contaminação) e entre 0,18-0,20  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (considerando o caso menos grave de contaminação).

Segundo a ATSRD (2012), a dose de referência definida é de 1,5 mg  $\text{Cr}^{3+} \text{ kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , sendo possível observar que, no presente estudo, as plantas contaminadas com crômio não apresentam valores de IDE superiores a essas quantidades recomendadas/toleráveis, não havendo risco associado. Através da comparação dos valores de IDE obtidos no presente trabalho e o valor de ingestão diária tolerável estabelecido pela EFSA (2014b) de 300  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , também se verifica que os valores são bastante inferiores.

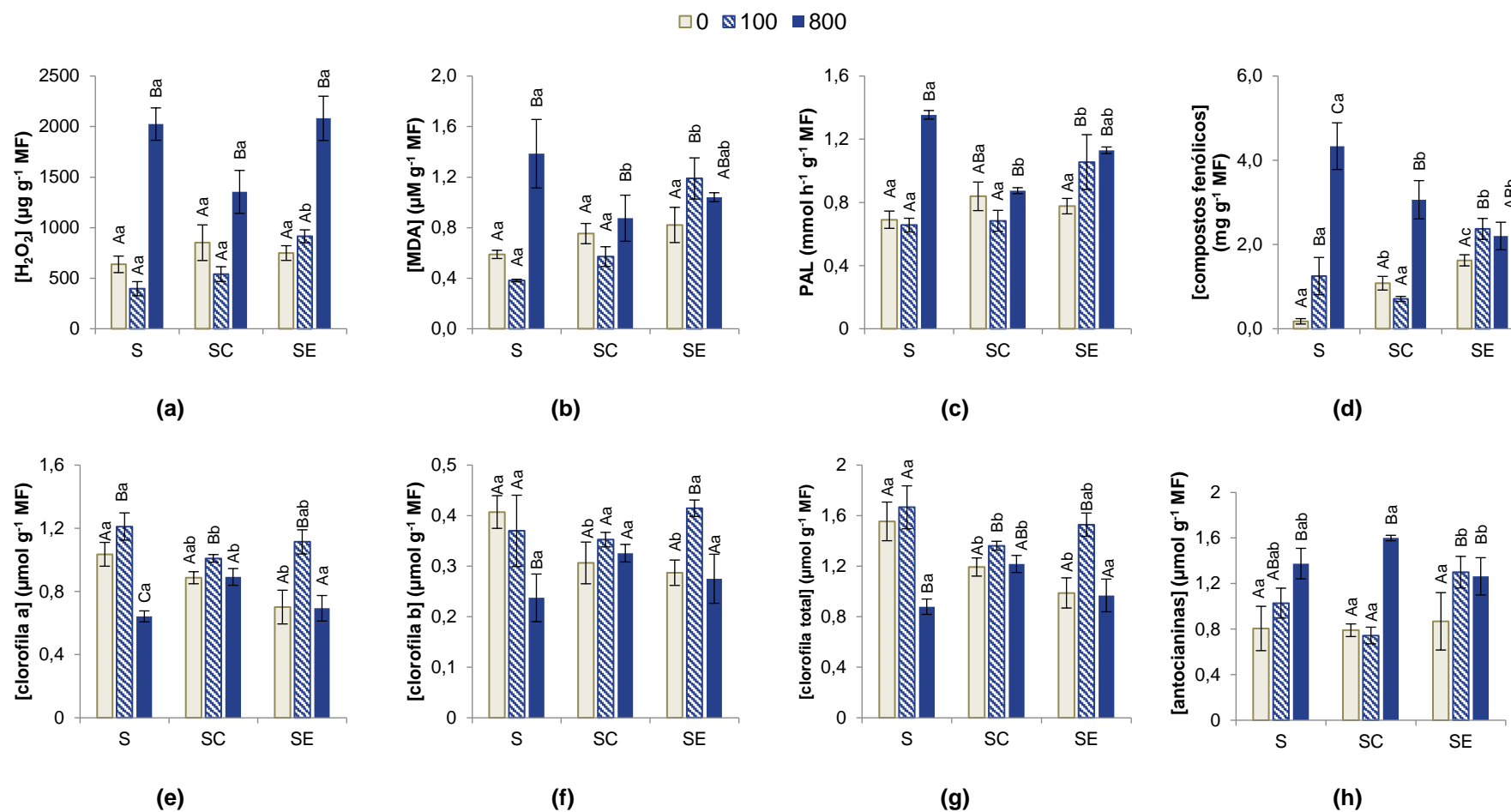
Outros autores verificaram que a ingestão diária total estimada de crômio excedeu substancialmente o valor admissível na dieta, a partir de alface (Liao et al., 2011) e noutros vegetais (Ding et al., 2014), embora noutro caso se tenha verificado que os teores de crômio estavam dentro dos níveis de segurança para consumo humano (Khan et al., 2013).

Nos seres humanos, as taxas de absorção de crômio no trato gastrointestinal são relativamente baixas e dependem de vários de fatores, incluindo o estado de valência (o  $\text{Cr}^{6+}$  é mais facilmente absorvido que  $\text{Cr}^{3+}$ ), a forma química (o crômio orgânico é mais facilmente absorvido que o crômio inorgânico), a solubilidade em água e o tempo de trânsito gastrointestinal (ATSDR, 2011). Independentemente da fonte, o  $\text{Cr}^{3+}$  é amplamente distribuído no corpo e é responsável pela maior parte do crômio presente no plasma ou nos tecidos. Após a absorção, o  $\text{Cr}^{3+}$  liga-se às proteínas plasmáticas, como a transferrina, e apenas uma pequena quantidade (~ 5 %) está presente na forma não ligada. O crômio é então transportado para o fígado onde é sequestrado, sendo também absorvido pelo baço, tecido mole e ossos. A urina é a principal via de excreção do crômio absorvido, sendo pequenas quantidades excretadas pela bile e na transpiração (EFSA, 2014b).

#### 6.4.2.5. Caracterização da resposta da planta

Os resultados obtidos para os parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos oxidativos, parâmetros de avaliação da intensidade do stresse e defesa antioxidante estão nas **Figuras 6.22 e 6.23**. A representação esquemática de caracterização da resposta antioxidante da alface M4E face à presença de crômio está na **Figura 6.24**.

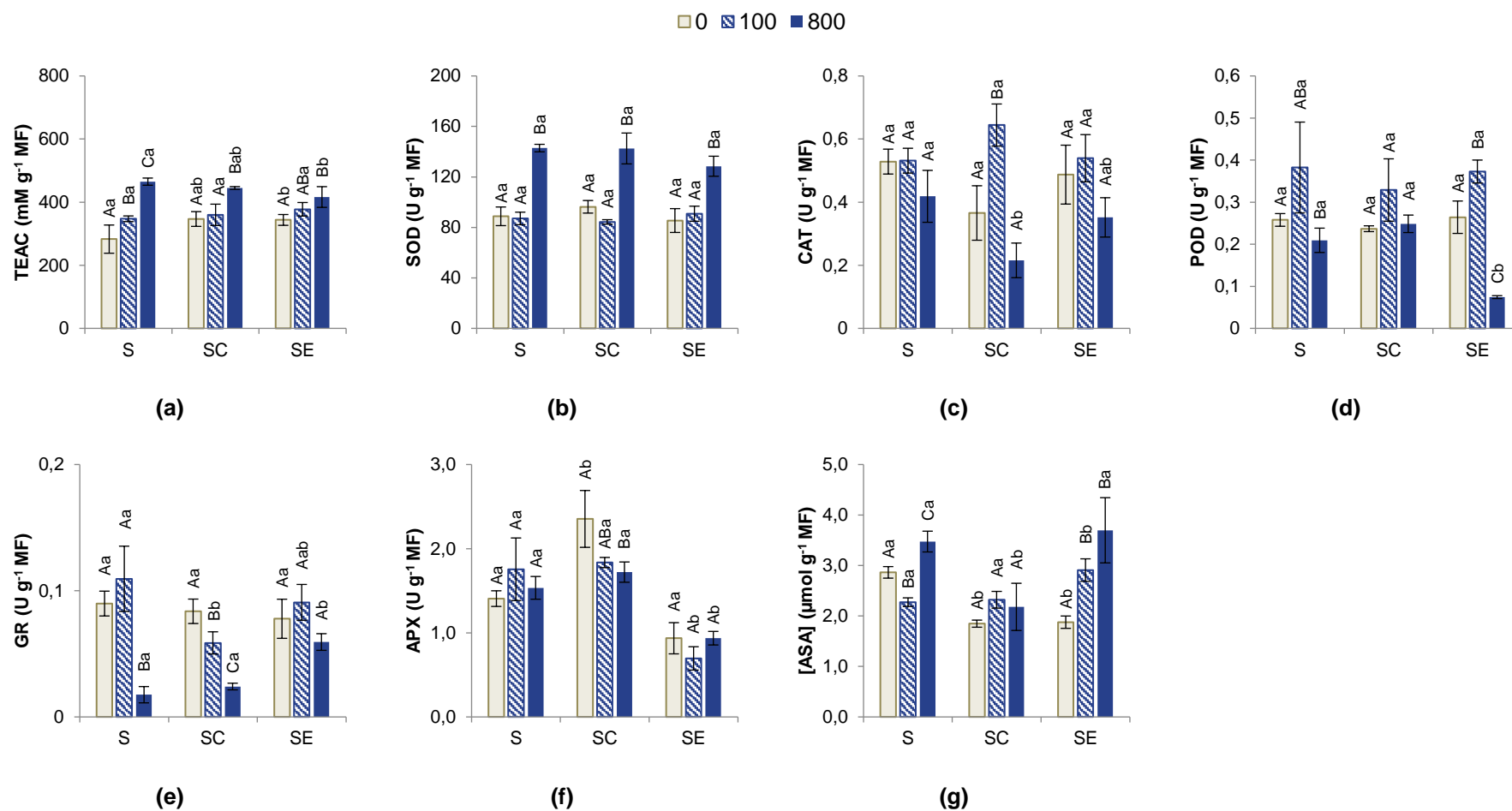




**Figura 6.22** – Parâmetros indicadores de stresse oxidativo (a) e danos nas membranas (b) e parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (c, d, e, f, g, h) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 100 e 800 mg Cr kg<sup>-1</sup>, com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

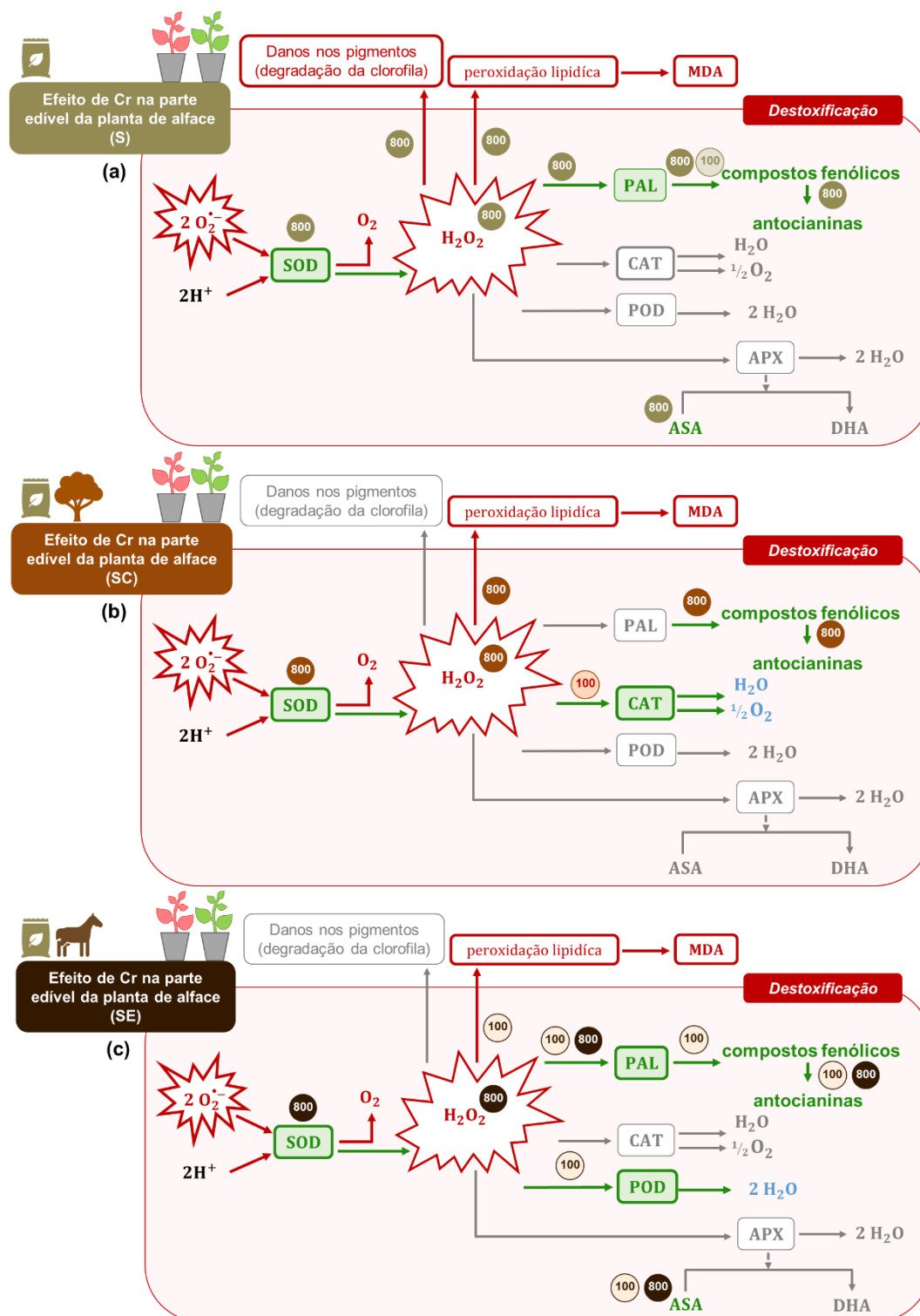
As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controle e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Cr aplicado ( $n=3$ ).





**Figura 6.23** – Atividade antioxidante total (a), enzimas antioxidantes (b,c,d,e,f) e concentração de ascorbato (g) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 100 e 800 mg Cr kg<sup>-1</sup>, com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controle e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Cr aplicado ( $n=3$ ).



**Figura 6.24** – Representação esquemática da resposta antioxidante de alface M4E contaminada com 100 e 800 mg Cr kg<sup>-1</sup> e sujeita a diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

A **verde** estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a **vermelho** os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a **azul** os compostos formados que não são prejudiciais.



### Solos sem adição de corretivos (S)

Nas plantas contaminadas com 100 mg Cr kg<sup>-1</sup> sem adição de corretivos, não existem diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nem danos oxidativos (MDA) entre plantas controlo e as plantas contaminadas. Diwan et al. (2010) também observaram que baixas doses de Cr (100 mg Cr kg<sup>-1</sup>) não levaram ao aparecimento de danos nos lípidos em plantas de *Brassica juncea*.

A atividade antioxidante aumentar de forma significativa em plantas contaminadas com 100 mg Cr kg<sup>-1</sup>. Relativamente aos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, não existem diferenças significativas na concentração de clorofila b e total, havendo um aumento significativo no teor de clorofila a. Também não existem diferenças significativas nos teores de antocianinas, nem na atividade da PAL. Por outro lado, a concentração de compostos fenólicos aumenta significativamente nestas plantas (**Figura 6.24-a**).

Não se observam diferenças significativas na atividade enzimática de nenhuma enzima antioxidante e o teor de ASA diminui significativamente relativamente ao controlo. Estes resultados indicam que esta concentração de Cr não foi suficiente para desencadear uma resposta mais intensa na planta.

Nas plantas contaminadas com 800 mg Cr kg<sup>-1</sup> sem adição de corretivos, já se observa um aumento muito significativo nos teores de peróxido de hidrogénio e de MDA, comparativamente às plantas controlo. Quando as plantas estão expostas a concentrações excessivas de Cr, a produção de ROS pode aumentar, causando um desequilíbrio entre a geração e a remoção de ROS. A presença de Cr em solos é conhecida por promover a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em excesso (Islam et al., 2016; Islam et al., 2014).

O aumento da peroxidação lipídica observado no presente estudo indica que existe stresse oxidativo devido ao aumento da produção das ROS que desencadeiam danos oxidativos nas membranas. Outros autores também verificaram o aparecimento de danos nos lípidos em plantas contaminadas com crómio em solos (Paul e Shakya, 2013; Qing et al., 2015).

Os teores de clorofila a, b e total diminuem significativamente em relação às plantas controlo, evidenciando o aparecimento de cloroses nas folhas. Esta diminuição na concentração deste pigmento fotossintético é acompanhada por um aumento do teor de antocianinas, tal como se pode observar visualmente (**Figura 6.21-a**). A exposição a esta concentração também origina um aumento muito significativo dos compostos fenólicos presentes e na atividade da PAL.



A capacidade antioxidante total aumenta significativamente, indicando que o sistema antioxidante está ativo. Em relação à atividade enzimática, a única enzima que apresenta um aumento significativo é a SOD. Por este motivo, provavelmente o radical  $O_2^{\bullet-}$  está a ser convertido em  $H_2O_2$ , e daí o seu aumento significativo nas células. A ativação da SOD induzida pela presença de Cr pode ocorrer devido a um aumento dos níveis de  $O_2^{\bullet-}$  ou por ação direta na SOD. Este aumento da atividade SOD como resultado da toxicidade do crómio também tem sido referida por outros autores (Diwan et al., 2010; Maiti et al., 2012; Tripathi et al., 2015; UdDin et al., 2015). Relativamente às outras enzimas antioxidantes, a CAT, POD, GR e APX não estão envolvidas nos mecanismos de defesa face a estas condições de ensaio. Por outro lado, verifica-se um aumento significativo na concentração de ASA, provavelmente porque este metabolito antioxidante está ativo na tentativa de eliminação do  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , pois tem a capacidade de se oxidar, dando origem ao monodesidroascorbato (MDHA) e ao desidroascorbato (DHA) (**Figura 6.24-a**).

Nas plantas contaminadas com  $100 \text{ mg Cr kg}^{-1}$ , aparentemente, existe a ativação de reações secundárias de defesa com a produção de compostos fenólicos que, provavelmente, atuam como quelantes de Cr e/ou eliminam das ROS.

Nas plantas contaminadas com  $800 \text{ mg Cr kg}^{-1}$ , sem adição de corretivos, existe a produção de  $H_2O_2$  que poderá resultar da atividade da SOD através da dismutação do  $O_2^{\bullet-}$ , que origina danos oxidativos nas células, nomeadamente a peroxidação lipídica e danos nos pigmentos. A forma da planta de alface lidar com o stresse induzido por estas condições de ensaio é através do aumento do teor de ASA e na ativação reações secundárias para combater o  $H_2O_2$  em excesso nomeadamente no aumento da atividade da PAL e, por consequência, do aumento da produção de compostos fenólicos e antocianinas que resultam.

### **Solos com adição de cortiça (SC)**

Nas plantas contaminadas com  $100 \text{ mg Cr kg}^{-1}$  com adição de cortiça, não se observam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo ( $H_2O_2$ ) e danos nas membranas (MDA), bem como nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (antocianinas, compostos fenólicos e PAL). O teor de clorofila a e total aumenta de forma significativa, comparativamente às plantas controlo, não se observando diferenças significativas nos teores de clorofila b.

Nestas condições de ensaio, não se observam diferenças significativas na atividade antioxidante, indicando baixos níveis de capacidade antioxidante na planta o que está de



acordo com os resultados obtidos para os parâmetros em estudo, assim como para os resultados obtidos para o ASA e todas as enzimas antioxidantes, à exceção da CAT.

A atividade desta enzima aumenta de forma bastante significativa, comparativamente ao controlo. A CAT é uma das principais enzimas envolvidas na remoção de  $H_2O_2$ , estando relacionada com o controlo dos níveis de  $H_2O_2$  produzido em condições de stresse. A presença de crómio induziu o aumento da atividade da CAT em vários estudos realizados em solos com diferentes plantas (Adrees et al., 2015; Karthik et al., 2016; Rai et al., 2004; Yadav et al., 2010; Zaimoglu et al., 2011) (**Figura 6.24-b**).

Nas plantas contaminadas com  $800\text{ mg Cr kg}^{-1}$  com adição de cortiça, existe um aumento significativo nos teores de  $H_2O_2$  e de MDA, indicando que existe stresse oxidativo que origina o aparecimento da peroxidação lipídica.

A capacidade antioxidante total aumenta significativamente, em relação às plantas controlo, indicando a existência de um sistema antioxidante ativo. Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, verifica-se um aumento significativo nos teores de antocianinas e dos compostos fenólicos, comparativamente ao controlo. No entanto, não se observam diferenças na atividade da PAL, bem como nos teores de clorofila a, b e total. Estes resultados indicam que existe um estímulo na produção de compostos fenólicos e de antocianinas e, provavelmente, estes compostos atuam como sequestradores de Cr e/ou promovem a eliminação das ROS.

Não se observam diferenças significativas no teor de ASA e não se detetaram diferenças na atividade da maior parte das enzimas antioxidantes estudadas, havendo apenas um aumento significativo na atividade da SOD. Esta enzima está ativa na conversão do  $O_2^{\bullet-}$  em peróxido de hidrogénio, o que pode explicar os seus níveis elevados (**Figura 6.24-b**).

Nas plantas contaminadas com  $100\text{ mg Cr kg}^{-1}$ , onde é adicionada cortiça como corretivo orgânico, os níveis de  $H_2O_2$  estão controlados não se observando indícios de peroxidação lipídica nas células. A única forma de defesa da planta é a ativação da CAT o que pode explicar o facto de o teor de  $H_2O_2$  estar mais baixo, evitando o aparecimento de danos oxidativos nas células.

A presença de uma concentração mais elevada de Cr e a adição de cortiça no solo desencadeia stresse oxidativo derivado de um aumento dos níveis de  $H_2O_2$  nas células, com o consequente aparecimento de danos oxidativos, tal como se verifica para a modalidade sem adição de corretivos. Nestas condições, a produção de peróxido também resulta da atividade



significativa da SOD, mas neste caso a forma da planta lidar com o stresse consiste na produção de compostos fenólicos e antocianinas, que possivelmente tentam anular o efeito do excesso de  $H_2O_2$ .

### **Solos com adição de estrume de cavalo (SE)**

Nas plantas contaminadas com  $100\text{ mg Cr kg}^{-1}$  com adição de estrume, observa-se o aparecimento de danos oxidativos, devido ao aumento do teor de MDA, em relação às plantas controlo. Apesar da peroxidação lipídica, não se observam diferenças significativas no teor intracelular de  $H_2O_2$ , havendo apenas um ligeiro aumento, em relação, ao controlo.

A atividade antioxidante apresenta uma ligeira tendência para aumentar, comparativamente ao controlo, embora esse aumento não seja significativo. Existe um aumento significativo, comparativamente ao controlo, em todos os parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (clorofila a, b e total, antocianinas, compostos fenólicos e PAL).

Não se observam diferenças significativas nas atividades de maior parte das enzimas antioxidantes, à exceção da POD, que aumenta significativamente a sua atividade comparativamente ao controlo. Esta enzima está ativa na conversão do  $H_2O_2$  em água, podendo ser responsável pelo facto de não haver diferenças significativas ao nível de  $H_2O_2$ . Estes resultados estão de acordo com a observação de diferenças significativas nos teores de compostos fenólicos que são o substrato desta enzima e que devem estar a ser consumidos pela POD.

A concentração de ASA também aumenta significativamente em relação às plantas controlo, evidenciando que este metabolito antioxidante está ativo na defesa da planta face ao stresse. Contudo, a resposta da planta parece não ser suficiente evitar a formação de danos oxidativos (**Figura 6.24-c**).

Nas plantas contaminadas com  $800\text{ mg Cr kg}^{-1}$  com adição de estrume, há um aumento muito significativo do teor de  $H_2O_2$  evidenciando a ocorrência de stresse oxidativo nas células. Por outro lado, não existem diferenças significativas nos teores de MDA, comparativamente ao controlo, apesar de haver um ligeiro aumento evidenciando que poderá estar ativo um mecanismo de defesa que evita a presença de danos oxidativos.

A atividade antioxidante total aumenta de forma significativa, em relação às plantas controlo, sugerindo que existe um mecanismo de defesa contra ao stresse oxidativo induzido por esta concentração de crómio. Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, existe um



aumento da atividade da PAL que está ativa na produção de antocianinas. Estes pigmentos comportam-se como importantes compostos antioxidantes na defesa da planta nestas condições de stresse, podendo ser efetivos na eliminação das ROS, de modo a evitar a formação de peroxidação lipídica. Este aumento significativo deste pigmento também se observa visualmente através do aparecimento de uma coloração avermelhada nas folhas (**Figura 6.21-a**). Não se observaram diferenças significativas nos teores de polifenóis totais e clorofila a, b e total.

Existe um aumento significativo na atividade da SOD que atua na eliminação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$ , podendo daqui resultar o aumento do teor de peróxido detetado. As outras enzimas não estão ativas na defesa da planta face a estas condições de stresse. Observou-se também um aumento significativo do teor de ASA em relação ao controlo, indicando que este metabolito antioxidante está ativo (**Figura 6.24-c**).

Nas plantas expostas a  $100 \text{ mg Cr kg}^{-1}$ , quando se adiciona estrume ao solo observa-se que apesar de os níveis de  $H_2O_2$  não serem significativos, existem danos oxidativos nas células. A forma da planta responder ao stresse induzido pelo Cr consiste no estímulo da atividade da PAL que origina a ativação da produção de compostos fenólicos e antocianinas. Os níveis de  $H_2O_2$  também são controlados pela POD, assim como pelo aumento dos teores de ASA. Neste caso, a combinação da ação dos compostos fenólicos/ASA/POD poderá estar a formar um sistema antioxidante eficaz.

A exposição a  $800 \text{ mg Cr kg}^{-1}$  com a adição de estrume, resulta num comportamento muito semelhante ao observado à contaminação com esta concentração de Cr no solo sem adição de corretivos. Nestas condições de ensaio, existe o aumento significativo dos teores de  $H_2O_2$  resultantes da atividade da SOD. A forma da planta lidar com este stresse é a ativação da PAL e, conseqüente, produção de antocianinas, assim como o aumento do teor de ASA.

Em suma, nestas condições de ensaio, ao fim de 50 dias de exposição ao Cr, o stresse induzido em plantas que se desenvolveram em solos contaminados com  $800 \text{ mg Cr kg}^{-1}$  desencadeia uma resposta na planta focada maioritariamente na síntese de antocianinas, tal como verificado visualmente. As plantas expostas a  $800 \text{ mg Cr kg}^{-1}$  sem a adição de corretivos mostraram ser menos tolerantes ao stresse induzido pelo crómio, sendo isso evidenciando pelo aparecimento de danos nos lípidos e nos pigmentos.





#### 6.4.2.6. Avaliação da toxicidade induzida por Cr

Os valores obtidos para o Índice de Tolerância (IT), da parte edível das plantas de alface contaminadas com crómio que se desenvolveram em solo, com e sem adição de corretivos encontram-se apresentados na **Tabela 6.20**.

**Tabela 6.20** – Índice de tolerância da parte edível, de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Cr e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

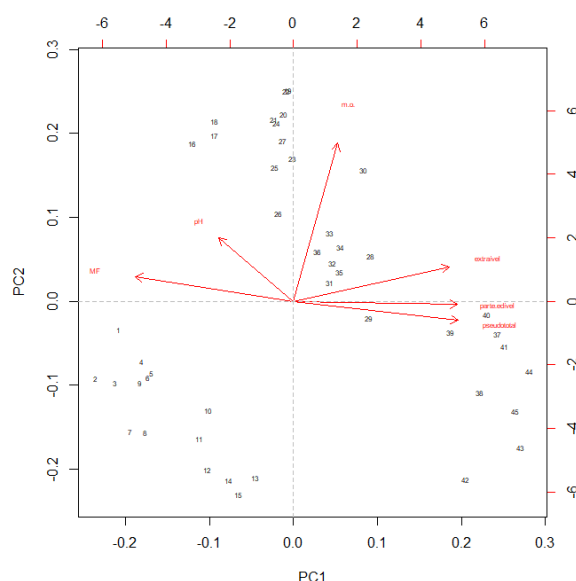
Modalidade	IT (%)				
	[Cr] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	100	200	400	800
S	100	96,41	75,61	63,40	14,97
SC	100	96,18	88,13	73,13	29,19
SE	100	99,03	95,84	71,86	19,06

O sombreado a cinza indica os valores de concentração de metal a partir dos quais o IT é inferior a 50 %, comparativamente ao controlo.

É possível verificar que o IT diminui de forma gradual com o aumento da concentração de Cr em solo, para todas as modalidades em estudo (S, SC, SE). Estes resultados estão de acordo com os obtidos para a massa fresca em que se verifica a sua diminuição com o aumento da concentração de crómio em solo.

O IT é inferior a 50 % para as plantas contaminadas com 800 mg Cr kg<sup>-1</sup> (S, SC, SE), comparativamente às plantas controlo, evidenciando que a exposição a esta concentração de crómio diminui a tolerância das plantas de alface. Tal como se pode observar, as plantas que se desenvolveram em solos sem adição de corretivos (S), apresentam um menor IT. Logo, a adição de corretivos a solos contaminados com Cr aumenta ligeiramente o índice de tolerância das plantas de alface, apesar de não reduzir a acumulação de crómio pela planta.

Para se avaliar a relação entre as variáveis estudadas realizou-se uma análise em componentes principais (ACP) (**Figura 6.25**). Nesta análise considerou-se 6 variáveis: parte edível (corresponde à concentração de Cr na parte edível, mg kg<sup>-1</sup> MS), pseudototal (corresponde à concentração de Cr na fração pseudototal, mg kg<sup>-1</sup> MS), extraível (corresponde à concentração de Cr na fração extraível, mg kg<sup>-1</sup> MS), pH, m.o. (matéria orgânica, %) e MF (massa fresca, g).



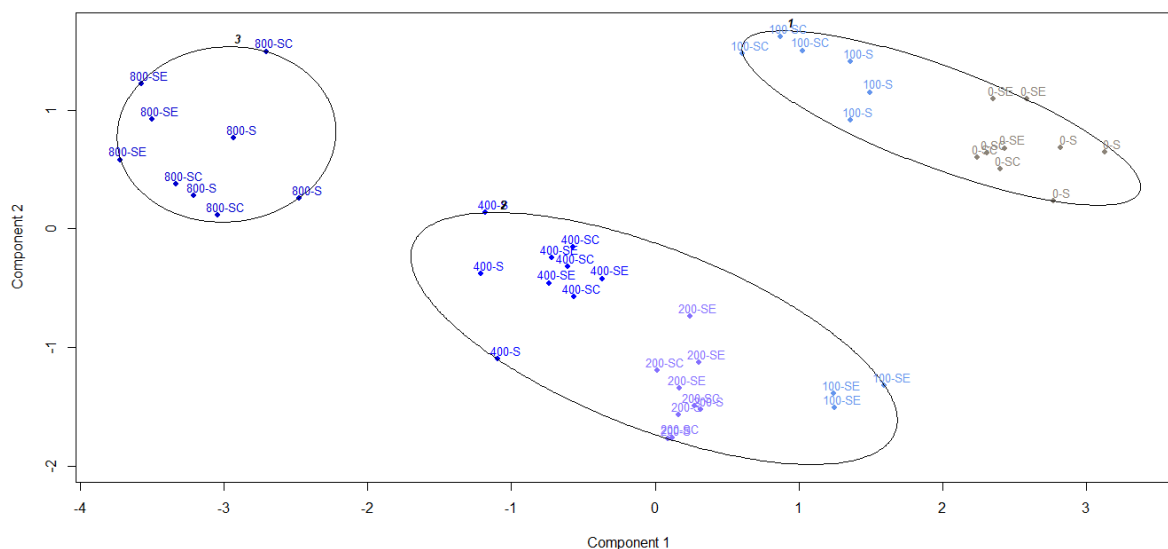
**Figura 6.25** – Análise em componentes principais realizada para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Cr (n=3), considerando 6 variáveis: *parte edível*, *pseudototal*, *extraível*, *pH*, *m.o.* e *MF*.

As variáveis estão representadas a **vermelho**: vetores paralelos, significa que as variáveis estão bem correlacionadas; vetores com o cosseno do ângulo superior a  $90^\circ$  indicam uma má correlação.

Através da ACP é possível verificar que as variáveis que correspondem à concentração de Cr presente na fração pseudototal, extraível e na parte edível estão bem correlacionadas, o que faz sentido, uma vez que quanto maior a concentração de Cr presente no solo (pseudototal e extraível), maior será a quantidade deste elemento presente na parte edível da alface. Por outro lado, a variável massa fresca e o pH estão correlacionados e apresentam um comportamento oposto ao das outras 3 variáveis.

Uma vez que o aumento da concentração de Cr presente no solo provoca uma diminuição do pH do solo, assim como um aumento no teor deste elemento na parte edível da alface e que tem influência direta no tamanho da planta, levando a uma diminuição da massa fresca. A variável matéria orgânica não está diretamente correlacionada com as restantes variáveis em estudo. A ACP é explicada num total de 81,39 % pela relação entre a componente principal 1 e a componente principal 2 (PC1 vs PC2).

Para se avaliar a toxicidade dos EPTs estudados realizou-se uma análise classificatória com o método de partição (PAM) que permitisse separar os indivíduos por classes (**Figura 6.26**), considerando-se as 6 variáveis referidas anteriormente.



**Figura 6.26** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Cr (n=3). Estas duas componentes explicam 81,39 % da variabilidade.

Os indivíduos estão apresentados com base na concentração de Cr (0, 100, 200, 400, 800 mg kg<sup>-1</sup>) e na modalidade aplicada (S- sem adição de corretivos; SC- adição de cortiça; SE- adição de estrume).

Na análise classificatória verifica-se que existem três classes muito bem individualizadas. Numa classe encontram-se os indivíduos controlo e os indivíduos que foram expostos a menores concentrações de crómio (0 (S, SC, SE) e 100 mg Cr kg<sup>-1</sup> (S, SC)). Noutra classe, estão os indivíduos contaminados com concentrações intermédias de crómio (100 (SE), 200 e 400 mg Cr kg<sup>-1</sup>) e por fim, uma classe bastante diferenciada apenas com os indivíduos mais contaminados (800 mg Cr kg<sup>-1</sup>). Esta separação em classes evidencia o efeito gradual do stresse, observando-se, na maior parte dos casos, nuvens de pontos com os indivíduos contaminados com as mesmas concentrações mais próximos.

#### *Conclusões intercalares*

À medida que a concentração de crómio presente no solo aumenta observa-se as seguintes alterações nas propriedades do solo: (i) a fração extraível diminui ligeiramente nas modalidades (SC e SE), (ii) o pH do solo diminui de forma bastante significativa e (iii) o teor de matéria orgânica aumenta significativamente nas modalidades SC e SE. Apesar destas alterações não se verificam diferenças significativas na concentração de crómio acumulada na parte edível entre plantas sem adição de corretivos e com adição de corretivos.



Os valores das concentrações de crómio presente na parte edível são baixos, sendo isso comprovado pelos valores de FT obtidos, indicando uma baixa translocação para a parte aérea.

Os sintomas visíveis de toxicidade observados consistiram, nomeadamente, na diminuição gradual da biomassa com o aumento da concentração de crómio presente no solo e no aparecimento de uma coloração avermelhada nas plantas contaminadas com  $800 \text{ mg Cr kg}^{-1}$ , sendo estas plantas as que apresentam valores de IT menores. As plantas que cresceram em meios menos contaminados ( $100\text{-}400 \text{ mg Cr kg}^{-1}$ ), não evidenciaram sintomas claros de toxicidade.

Se considerarmos o teor de Cr acumulado na parte edível de plantas expostas a crómio é possível verificar que ultrapassa, em qualquer um dos casos, os valores de crómio em hortícolas considerados não contaminados,  $0,2\text{-}1,0 \text{ mg Cr kg}^{-1} \text{ MS}$  (Nagajyoti et al., 2010), para ambas as modalidades em estudo (S, SC e SE). No entanto, considerando a dose de referência referida o valor de ingestão diária tolerável estabelecida pela EFSA (2014b) é possível observar que todas as plantas contaminadas com crómio apresentam valores de IDE inferiores, não havendo risco associado.

Pode-se concluir que nestas condições de ensaio, a adição dos corretivos testados neste trabalho (estrume de cavalo e pó de cortiça), não contribuíram para a diminuição da acumulação de crómio pela planta. Para além disso, as plantas menos contaminadas ( $100\text{-}400 \text{ mg Cr kg}^{-1}$ ) não apresentam sintomas visíveis de toxicidade, no entanto, acumulam uma quantidade de Cr, na parte edível, superior ao valor que é recomendável em hortícolas. No entanto, os valores de IDE não são preocupantes para se considerar um risco na cadeia alimentar.



### 6.4.3. Chumbo

#### 6.4.3.1. Caracterização do solo artificialmente contaminado com Pb

Na **Figura 6.27-a** apresentam-se as medições dos valores pseudototais de Pb no solo que são bastante próximos dos valores nominais (a quantidade teoricamente adicionada). As frações extraíveis, considerando a maior contaminação de chumbo, correspondem a 0,059, 0,067 e 0,072 %, do total presente no solo S, SC e SE, respetivamente (**Figura 6.27-b**).

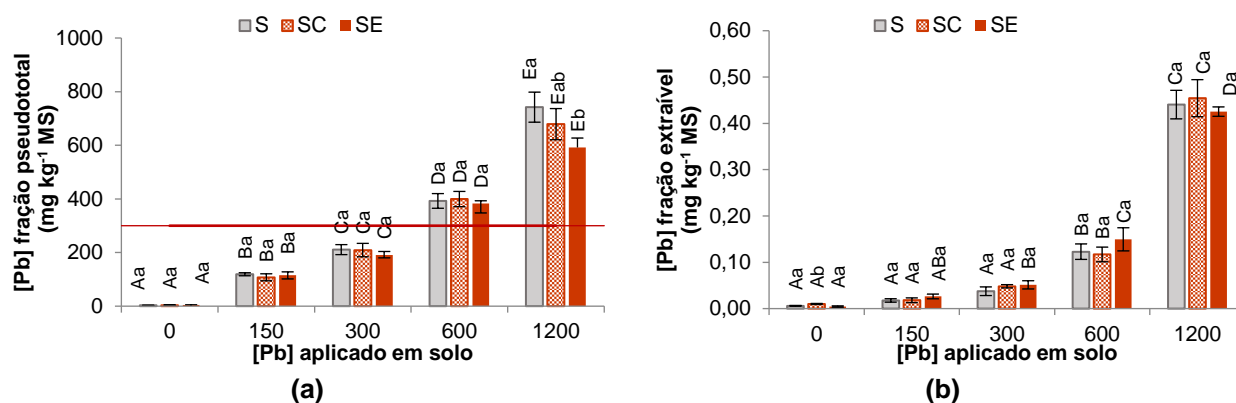
Segundo o Decreto-lei (n.º 276/2009), o valor de referência de Pb em solos neutros, aos quais se pretende adicionar lamas de depuração, é de 300 mg Pb kg<sup>-1</sup>. Se considerarmos solos em que se pretende aplicar matéria fertilizante, o valor é de 70 mg Pb kg<sup>-1</sup> (Decreto-Lei, n.º 103/2015). A legislação canadiana define o valor de 45 mg kg<sup>-1</sup> para uso agrícola. A legislação holandesa refere o valor referência é de 85 mg Pb kg<sup>-1</sup> e o valor de intervenção é de 530 mg Pb kg<sup>-1</sup> (Leitão et al., 2016b).

A concentração de Pb na fração extraível, apenas é significativamente superior ao controlo a partir de 300 mg Pb kg<sup>-1</sup>, para a modalidade SE, e 600 mg Pb kg<sup>-1</sup>, para as modalidades S e SC (**Figura 6.27-b**). Existe um grande aumento na concentração de chumbo extraível no solo contaminado com 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup>, para todas as modalidades (S, SC, SE). Nas concentrações mais baixas, a concentração de chumbo extraível é muito baixa, isto deve-se muito provavelmente à baixa mobilidade deste elemento no solo. Entre modalidades não se observam diferenças significativas. Ao contrário do que seria de esperar, estes dados mostram que a presença destes dois corretivos orgânicos não teve influência no teor de Pb extraível.

Os resultados obtidos para o pH, matéria orgânica, fósforo extraível e potássio extraível encontram-se representados na **Figura 6.28**.

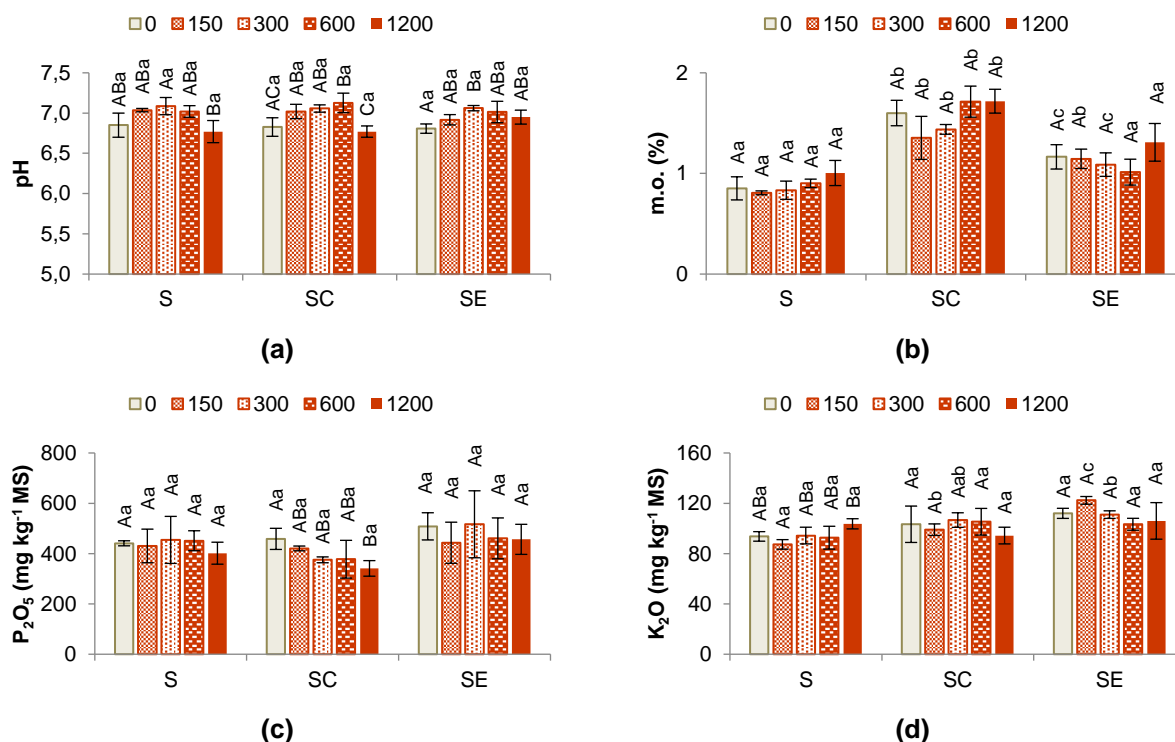
Os resultados obtidos para o pH (**Figura 6.28-a**), fósforo extraível (**Figura 6.28-c**) e potássio extraível (**Figura 6.28-d**) mostram que não existe um efeito evidente deste EPT nestas variáveis, comparando a amostra controlo e amostras contaminadas, bem como entre as diferentes modalidades (S, SC, SE). Os valores de K<sub>2</sub>O encontram-se médios (50-100) a altos (100-200) e os de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> muito elevados (> 200). Os valores de pH do solo variam entre 6,5-7,5 (neutro).

Nos valores de matéria orgânica, como é expetável, existe um aumento significativo na modalidade SC, relativamente à amostra S.



**Figura 6.27** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Pb e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) concentração pseudototal de Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) e (b) concentração de Pb na fração extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Pb aplicado ( $n=3$ ). A linha **vermelha** representa o valor máximo de Pb que pode estar presente nos solos ( $300 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ ).



**Figura 6.28** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Pb e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) pH, (b) matéria orgânica (%), (c) fósforo extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) e (d) potássio extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Pb aplicado ( $n=3$ ).

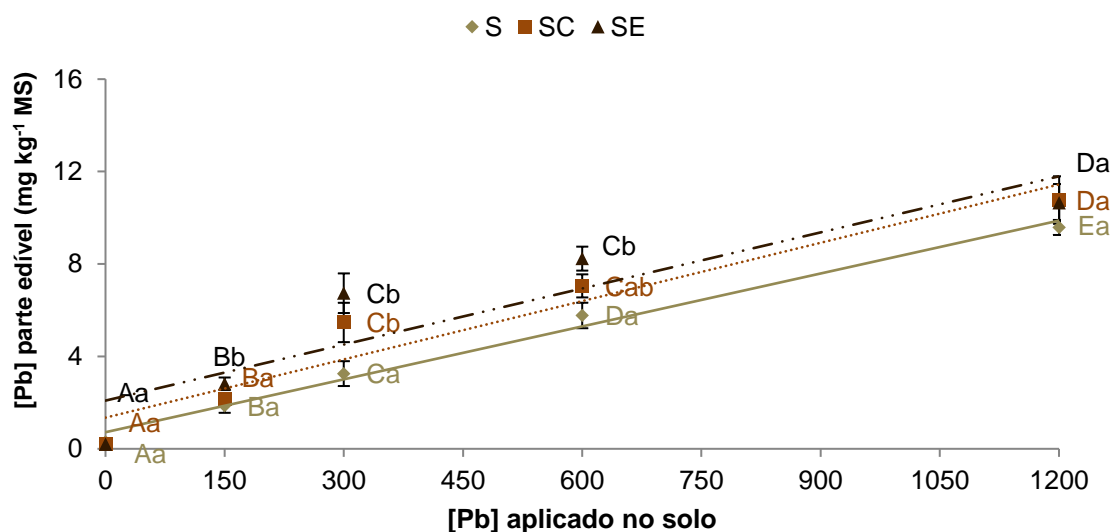


Nos solos SE também se observa um aumento significativo do teor de m.o., comparativamente ao solo S para as concentrações de 0, 150, 300 mg Pb kg<sup>-1</sup>. No entanto, em solos SE com 600 e 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> não se verificam diferenças significativas comparativamente ao solo S (**Figura 6.28-b**). Para além disso, também não se verificam diferenças significativas entre as amostras controlo e contaminadas para cada uma das modalidades.

Ao contrário do que seria de esperar, apesar do teor de matéria orgânica aumentar nas modalidades onde foram adicionados corretivos, aparentemente o teor de Pb extraível não diminui em nenhuma amostra de solo contaminada com chumbo, considerando as modalidades onde houve adição de corretivos.

#### 6.4.3.2. Caracterização da acumulação de Pb em alface

A acumulação de Pb pelas plantas de alface apresenta um comportamento linear (**Figura 6.29**).



dias	<i>m</i>	<i>b</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	Linha
S	0,0076	0,719	0,9897	—
SC	0,0084	1,349	0,9282	.....
SE	0,0081	2,087	0,8343	- - -

**Figura 6.29** – Concentração de Pb (mg kg<sup>-1</sup> MS) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controlo), 200, 400, 600 e 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup>, com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Pb aplicado ( $n=3$ ).





À medida que se aumenta a concentração de Pb no solo existe uma proporcionalidade direta na capacidade de acumulação de Pb na parte edível. Assim, existe um aumento significativo e crescente da concentração de Pb presente nas plantas contaminadas relativamente às plantas controlo. Os ajustes ao modelo linear estão representados pelas linhas da **Figura 6.29**, e, nestas condições de ensaio, verifica-se que existe um ajuste razoável ao modelo linear, tal como indicam os valores de  $R^2 > 0,83$ .

A planta de alface aparentemente continua a suportar a acumulação de Pb na parte aérea e até eventualmente a aplicação de concentrações mais elevadas para atingir a saturação, uma vez que existem diferenças significativas entre as plantas contaminadas com 600 e 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup>, para todas as modalidades em estudo, evidenciando que ainda não se atingiu uma presumível saturação. Para além disso, os valores da quantidade de Pb acumulada são muito semelhantes aos acumulados pela planta de alface contaminada com Cr (**Figura 6.20**), e bastante inferiores aos acumulados pela planta exposta a Cd (**Figura 6.11**), apesar das concentrações aplicadas nos solos serem muito diferentes.

Outros autores também obtiveram resultados de acumulação baixos em estudos realizados com plantas alimentares que se desenvolveram em solos contaminados com chumbo (Zhang et al., 2018). McBride et al. (2012) também realizaram um estudo com alface (*Lactuca sativa* c.v. “Black-seeded Simpson”) que se desenvolveu em solos contaminados com Pb (1140 mg Pb kg<sup>-1</sup> solo), tendo acumulado uma quantidade baixa de Pb (2,25±0,64 mg Pb kg<sup>-1</sup>), devido à sua baixa disponibilidade no solo. Hu et al. (2013) observaram que as plantas de alface acumularam quantidades muito baixas de Pb (0,036±0,006) em solos contaminados com 83,0±4,0 mg Pb kg<sup>-1</sup>. Augustsson et al. (2015) referiram que os resultados mostram que as concentrações em vegetais, nomeadamente em alface (0,0064-4,8 mg Pb kg<sup>-1</sup>), foram apenas moderadamente elevadas apesar das elevadas concentrações presentes no solo (8,2-490,0 mg Pb kg<sup>-1</sup>). Mombo et al. (2016) mostraram que em solos de hortas urbanas ligeiramente contaminados com Pb (77-236 mg Pb kg<sup>-1</sup> solo), já ocorreu uma contaminação significativa na alface (até 9,8 mg kg<sup>-1</sup>). Estes resultados vêm reforçar a ideia que independente da quantidade de Pb presente no solo, o teor de Pb acumulado na alface depende da cultivar e evidenciam que o chumbo é um EPT pouco translocado para a parte edível.

As plantas contaminadas que se desenvolveram em solos sem a adição de corretivos, verifica-se uma quantidade menor de Pb na parte edível, comparativamente às modalidades SC e SE. No entanto, considerando a contaminação com 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> é possível verificar que não existem diferenças significativas entre as diferentes modalidades. A adição de cortiça e



estrupe leva a um aumento na acumulação de Pb de 12,4 e 11,2 %, relativamente à amostra sem adição de corretivos, respetivamente. Na presença de Pb no solo, também não é possível verificar o efeito da adição de corretivos ricos em matéria orgânica na diminuição de Pb acumulado nos tecidos das plantas de alface.

Vários estudos foram realizados com a aplicação de corretivos orgânicos aos solos contaminados com chumbo (Houben et al., 2013; Park et al., 2011; Shaheen et al., 2017; Tang et al., 2015; Usman et al., 2013), verificando-se de um modo geral uma diminuição da solubilidade dos metais reduzindo a sua disponibilidade para as plantas, tal como observado para as plantas de alface em vários estudos (Ahmad et al., 2012; Galende et al., 2014).

No entanto, tal como no presente estudo, McBride et al. (2012) também observaram que um composto à base de estrume de bovino, não teve efeito significativo na diminuição da transferência de Pb do solo para a alface ( $1,95 \pm 0,26$  mg Pb kg<sup>-1</sup>), comparativamente às plantas sem adição de estrume ( $2,25 \pm 0,64$  mg Pb kg<sup>-1</sup>). No entanto, os autores atribuem estes resultados à baixa solubilidade e disponibilidade de Pb no solo, devido ao teor de matéria orgânica elevada inerente e ao facto de o pH do solo ser quase neutro.

Se considerarmos o teor de Pb presente na parte aérea de plantas expostas a 150 mg Pb kg<sup>-1</sup> ( $0,69 \pm 0,11$  mg Pb kg<sup>-1</sup> MF (S),  $0,80 \pm 0,06$  mg Pb kg<sup>-1</sup> MF (SC) e  $1,04 \pm 0,10$  mg Pb kg<sup>-1</sup> MF (SE)) e plantas contaminadas com 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> ( $3,55 \pm 0,12$  mg Pb kg<sup>-1</sup> MF (S),  $3,99 \pm 0,38$  mg Pb kg<sup>-1</sup> MF (SC) e  $3,95 \pm 0,30$  mg Pb kg<sup>-1</sup> MF (SE)), é possível verificar que os valores obtidos ultrapassam o limite máximo permitido pela legislação em vigor para hortícolas de folha de 0,30 mg Pb kg<sup>-1</sup> MF (Commission Regulation (EU) 1005/2015), para ambas as modalidades em estudo (S, SC e SE).

Os resultados obtidos para o fator de transferência do solo encontram-se apresentados na **Tabela 6.21**.

O fator de transferência do solo não apresenta grandes variações com o aumento da concentração de Pb no solo. No entanto, é evidente que a capacidade da planta em transferir o Pb para a sua parte edível não depende da quantidade de Pb presente no solo.

Tal como se pode verificar, a modalidade S apresenta um FT menor comparativamente às modalidades SC e SE, o que está de acordo com os valores acumulados de Pb (**Figura 6.29**), uma vez que é nesta modalidade que se acumulam quantidades ligeiramente menores deste EPT. Neste sentido, a adição de corretivos orgânicos, possivelmente, não tem o efeito



desejado de diminuição da capacidade da planta em transferir o Pb presente no solo para a parte aérea da planta.

**Tabela 6.21** – Fator de transferência do solo para a alface M4E que se desenvolveu em solo, sujeita a diferentes concentrações de Pb e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

Modalidade	Fator de transferência (FT)				
	[Pb] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	150	300	600	1200
S	0,004	0,016	0,015	0,015	0,013
SC	0,005	0,020	0,026	0,018	0,016
SE	0,007	0,024	0,035	0,022	0,018

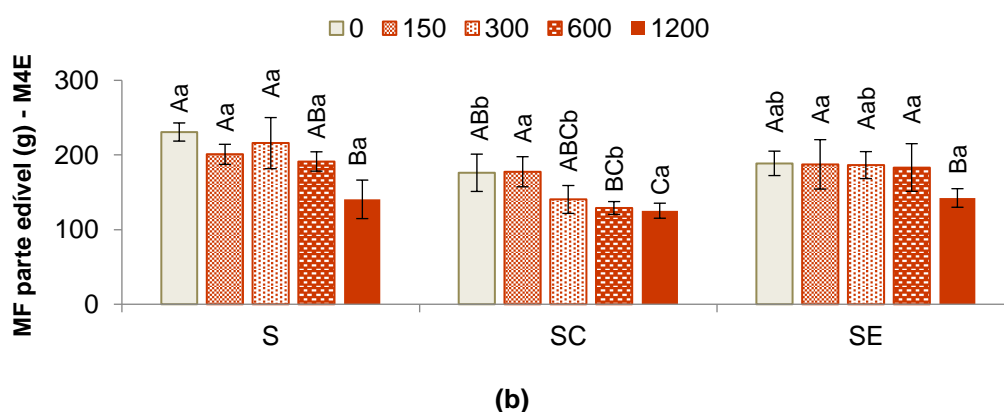
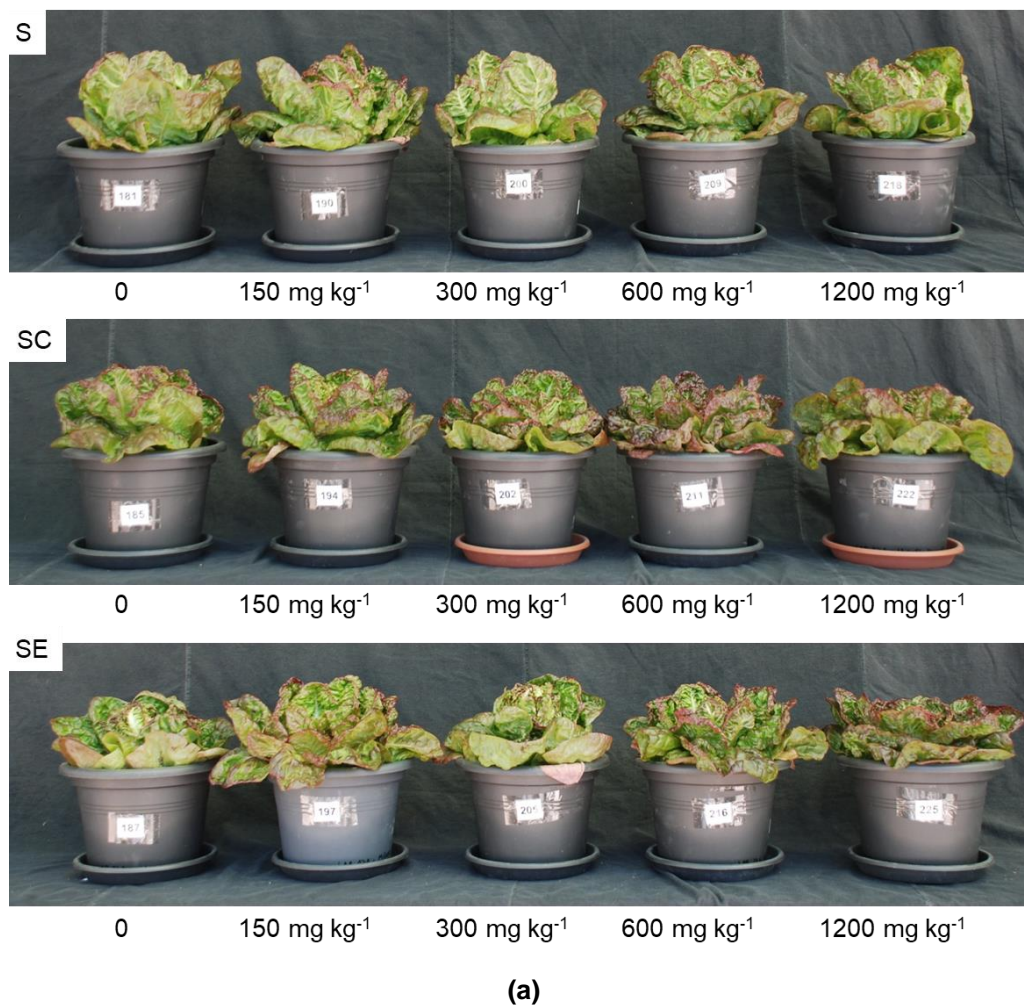
Os valores obtidos de FT para o Pb são muito baixos relativamente aos valores que são apresentados para o Cd (**Tabela 6.13**) e semelhantes aos obtidos para o Cr (**Tabela 6.17**), indicando que o chumbo é um elemento difícil de ser transferido do solo para a parte aérea da planta de alface, tal como verificado no **Capítulo IV**.

Vários autores também fazem referência a valores de FT obtidos para alface contaminada com chumbo, nomeadamente valores mais elevados aos obtidos no presente estudo, tal como, 0,49 para uma concentração de 29,0±22,0-138,0±46,0 mg Pb kg<sup>-1</sup> solo (Khan et al., 2010), 0,04 para uma concentração de 66,0±44,0 mg Pb kg<sup>-1</sup> solo (Xu et al., 2013) e 0,09-0,25 para uma concentração de 5,9±1,2 mg Pb kg<sup>-1</sup> solo (Wang et al., 2012). Outros autores obtiveram valores muito semelhantes aos obtidos no presente estudo em alface, 0,003-0,009 para uma concentração de 4500 mg Pb kg<sup>-1</sup> solo (Luo et al., 2011), e 0,002 para uma concentração de 1122±768 mg Pb kg<sup>-1</sup> solo (Waterlot et al., 2013).

#### 6.4.3.3. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade

Na **Figura 6.30** encontram-se os resultados obtidos para a massa fresca da parte edível e os sintomas visíveis de toxicidade observados na alface M4E para cada modalidade e para diferentes concentrações de chumbo.

Nestas condições de ensaio, visualmente as alfaces apresentam-se com bom aspeto e não se observam indícios visíveis de toxicidade nas plantas contaminadas com Pb (**Figura 6.30-a**).



**Figura 6.30** – Massa fresca da parte edível (a) e o registo fotográfico (b) de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo contaminado com Pb e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Pb aplicado ( $n=3$ ).



O não aparecimento de sintomas visíveis de toxicidade no presente estudo, apesar da acumulação significativa de Pb na parte edível, provavelmente, pode ser explicado pelo Pb ser pouco translocado para a parte aérea, tal como o Cr, e pelas razões descritas em 6.4.2.3.

É possível verificar que em todas as modalidades S, SC e SE, não existem diferenças significativas na massa fresca da parte edível de plantas contaminadas com 150, 300 e 600 mg Pb kg<sup>-1</sup>, comparativamente às plantas controlo. Apenas se observa uma diminuição significativa na massa fresca da parte edível de plantas contaminadas com 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> para todas as modalidades, em relação às plantas controlo. Os valores percentuais de diminuição da biomassa das plantas contaminadas com a maior concentração de chumbo, comparativamente às plantas controlo, correspondem a 39,1, 28,9 e 24,6 %, para as modalidades S, SC e SE, respetivamente (**Figura 6.30-b**).

#### 6.4.3.4. Avaliação do risco associado à ingestão de Pb

No sentido de perceber a quantidade de Pb a que poderá estar exposta a população portuguesa através da ingestão de alface contaminada são apresentados na **Tabela 6.22** os resultados obtidos para a ingestão diária estimada de Pb através do consumo de alface. Na **Tabela 6.23** estão os parâmetros de avaliação associados à presença de Pb na saúde do Homem.

**Tabela 6.22** – Ingestão diária estimada, da parte edível de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Pb e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

Modalidade	IDE (mg dia <sup>-1</sup> )*				
	[Pb] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	150	300	600	1200
S	0,0025	0,0155	0,0271	0,0481	0,0798
SC	0,0018	0,0180	0,0456	0,0588	0,0897
SE	0,0017	0,0235	0,0561	0,0686	0,0888

\*considerando o valor médio de ingestão média diária de alface de 22,5 g dia<sup>-1</sup> para adultos (WHO, 2003).

A ingestão média diária de alface é de 22,5 g dia<sup>-1</sup> para adultos (WHO, 2003) e considera-se um teor médio de humidade nas plantas de alface de 97,3 %. A IDE estimada varia entre 0,0798 e 0,0888 mg dia<sup>-1</sup>, considerando o caso mais grave de contaminação (1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> solo). Para o nível de contaminação mais baixo (150 mg Pb kg<sup>-1</sup>) estes valores variam entre 0,0155 e 0,0235 mg dia<sup>-1</sup>.

**Tabela 6.23** – Parâmetros de avaliação associados à exposição ao Pb para a saúde do ser humano.

Parâmetros de avaliação	Valores referência obtidos para o Pb	Referências Bibliográficas
NOAEL	25 $\mu\text{g dL}^{-1}$	(Hough et al., 2004b)
RfD	0,35 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	(Hough et al., 2004b)
<i>Exposição diária</i>		
adultos	0,36-1,24 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	(EFSA, 2010)
(elevado consumo)	> 2,43 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	
bebês	0,21-0,94 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	
crianças	0,80-3,10 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	
(elevado consumo)	> 5,51 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	
PTMI	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(EFSA, 2010)

- NOAEL (do inglês, *No Observed Adverse Effect Level*) - concentração ou quantidade máxima de substância, que não causa efeito adverso num organismo vivo.

- RfD - dose de referência ou dose oral máxima aceitável de uma substância tóxica, que provavelmente não terá risco significativo de efeitos nocivos durante a vida.

- PTMI - (do inglês, *Provisional Tolerable Monthly Intake*) – ingestão mensal tolerável provisória sem risco de efeitos adversos para a saúde.

De acordo com os dados obtidos, considerando um homem adulto de 70 kg, a ingestão diária de Pb estimada varia entre 1,14-1,28  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (considerando o caso mais grave de contaminação) e entre 0,22-0,34  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (considerando o caso menos grave de contaminação).

Com base nos valores de dose de referência (0,35  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) é possível verificar que os valores obtidos para a IDE são inferiores apenas para as plantas contaminadas com a menor concentração de chumbo (150 mg Pb  $\text{kg}^{-1}$ ), porque nas restantes plantas todos os valores de IDE obtidos estão acima da dose de referência. Tendo em conta que a exposição média diária referida pela EFSA (2010) varia entre 0,36-1,24  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  pode-se verificar que no presente estudo, só pelo consumo de alface no caso mais grave de contaminação (1200 mg Pb  $\text{kg}^{-1}$  solo), se atingem valores próximos dessa gama de valores (1,28  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  na modalidade SC, e 1,26  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  na modalidade SE).

Num estudo realizado por Khan et al. (2010), os autores fizeram referência a um valor de ingestão diária através do consumo de alface contaminada com Pb de 0,0059 mg  $\text{kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (adulto) e 0,0089 mg  $\text{kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (criança). Tal como no presente estudo, os autores verificaram que a ingestão diária de Pb foi superior ao limite RfD, sugerindo que o consumo de vegetais cultivados na área de estudo pode causar riscos graves para a saúde devido à ingestão de Pb por adultos e crianças.





Vários estudos também investigaram a existência de um risco associado à ingestão de vegetais de folha, como a alface, cultivados em solos contaminados com Pb (Antoniadis et al., 2017; Luo et al., 2011; McBride et al., 2014; Xu et al., 2013), enquanto outros autores referem que os teores de Pb se encontravam dentro dos níveis de segurança para consumo humano (Antisari et al., 2015; Cruz et al., 2014; Mitchell et al., 2014).

A absorção de Pb, após entrar no corpo humano, depende de uma variedade de fatores. O sangue tem apenas uma pequena fração da carga total de chumbo, tornando-o disponível para todos os tecidos ou para ser excretado. O Pb absorvido que não é excretado pode ser armazenado no sangue, tecidos mineralizantes (ossos e dentes), que tipicamente contêm a maior parte da carga corporal, e tecidos moles (fígado, rins, pulmões, cérebro, baço, músculos e coração) (ATSDR, 2017). O tempo de semi-vida do Pb no sangue e ossos é de aproximadamente 30 dias e 10-30 anos, respectivamente, e a sua excreção ocorre principalmente pela urina e fezes (EFSA, 2010).

#### 6.4.3.5. Caracterização da resposta da planta

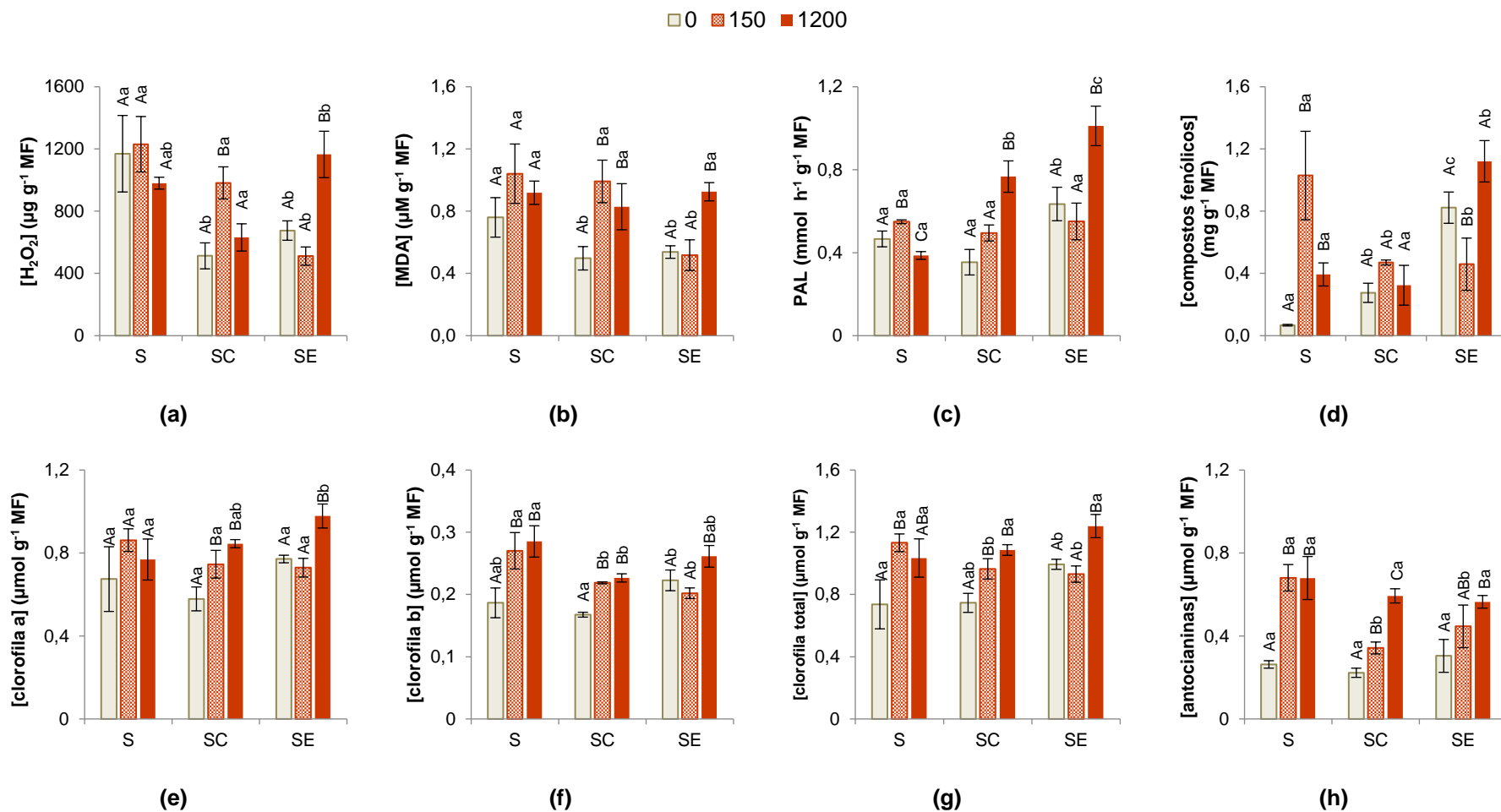
Os resultados obtidos relativos à resposta da planta encontram-se nas **Figuras 6.31 e 6.32**, e a representação esquemática de caracterização da resposta antioxidante da alface M4E está apresentado na **Figura 6.33**.

#### Solos sem adição de corretivos (S)

Não se observam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo ( $H_2O_2$ ) nem de danos oxidativos entre as plantas controlo e as plantas expostas a diferentes concentrações de Pb. Estes resultados indicam que não existem danos oxidativos nas células nem indícios de stresse oxidativo.

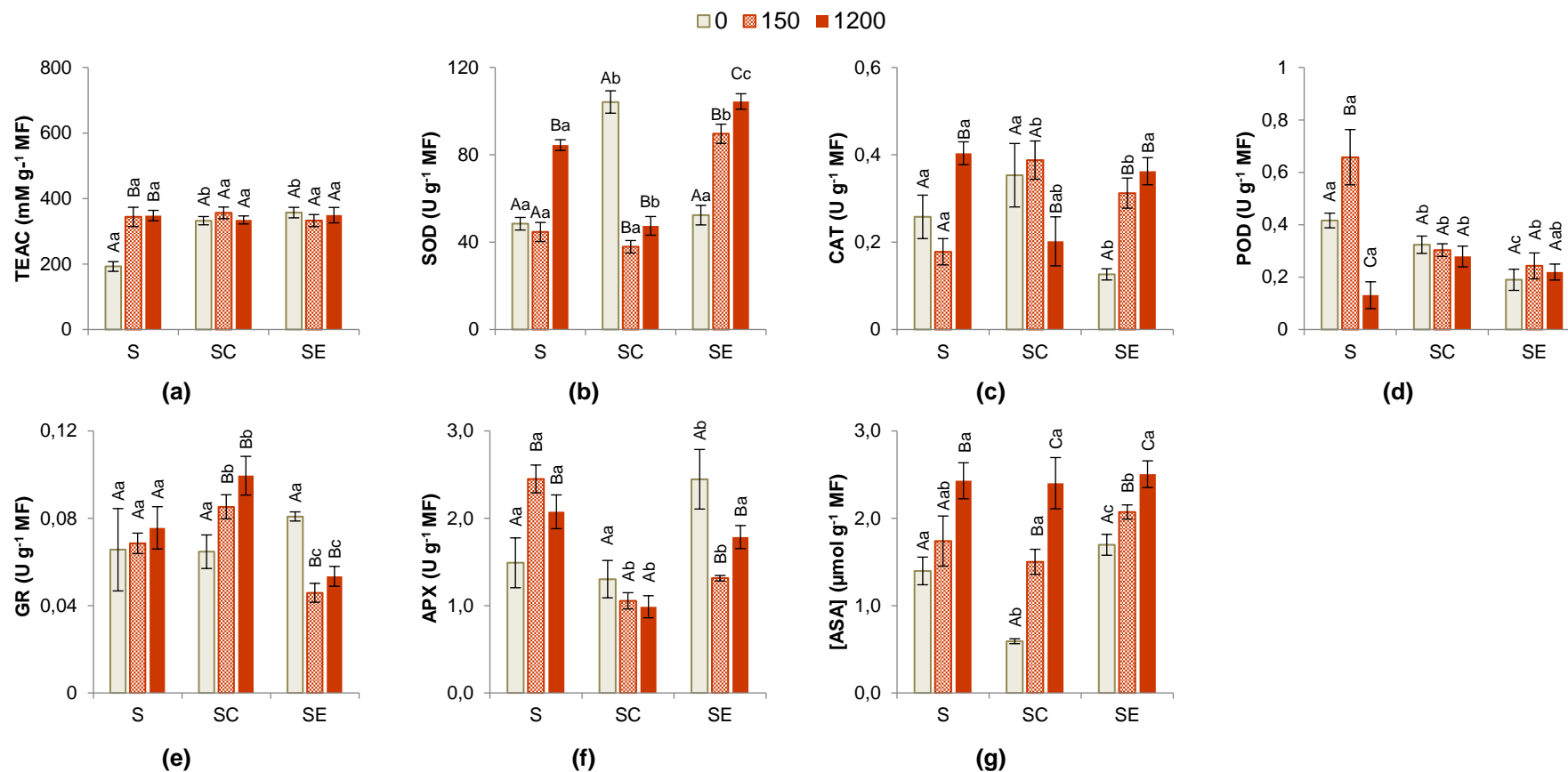
Uma explicação possível para estes resultados é a existência de uma resposta enzimática ou não-enzimática, eficiente, que pode influenciar o nível de  $H_2O_2$  nas células, através de ativação de enzimas que atuam neste substrato. Por este motivo, o teor das ROS formadas não é suficiente para produzir danos nas membranas.





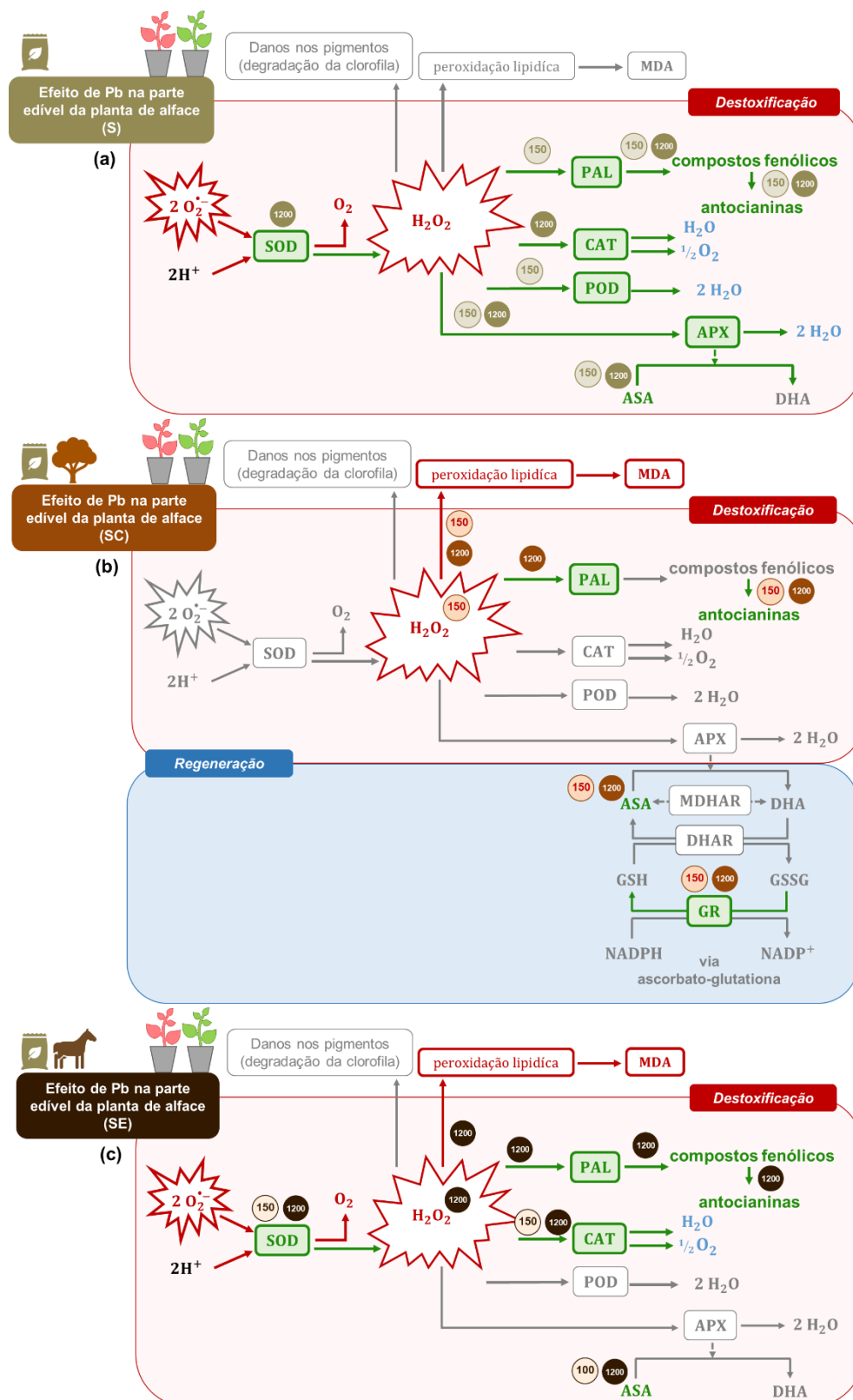
**Figura 6.31** – Parâmetros indicadores de stresse oxidativo (a) e danos nas membranas (b) e parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (c, d, e, f, g, h) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 150 e 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup>, com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controle e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Pb aplicado ( $n=3$ ).



**Figura 6.32** – Atividade antioxidante total (a), enzimas antioxidantes (b,c,d,e,f) e metabolitos antioxidantes (g) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 150 e 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup>, com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controle e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Pb aplicado ( $n=3$ ).



**Figura 6.33** – Representação esquemática da resposta antioxidante de alfaca M4E contaminada com 150 e 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> e sujeita a diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

A **verde** estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a **vermelho** os compostos ou reações que são adversos; a cinza os mecanismos de defesa ou reações inativas; a **azul** os compostos formados que não são prejudiciais.



Nas plantas contaminadas com 150 mg Pb kg<sup>-1</sup> sem adição de corretivos, a capacidade antioxidante total aumenta significativamente indicando a existência de uma capacidade antioxidante ativa.

Não se observam diferenças significativas nos teores de clorofila a, havendo um aumento nos teores de clorofila b e total, comparativamente às plantas controle. Estes resultados indicam que não existem danos nos pigmentos fotossintéticos nas plantas de alface expostas a esta concentração de Pb. O teor de compostos fenólicos, antocianinas e atividade da PAL aumenta de forma significativa, relativamente ao controle. Estes resultados estão concordantes, uma vez que um aumento da atividade da PAL induz a produção de compostos fenólicos e de antocianinas. Estes compostos são característicos da ativação de reações do metabolismo secundário, sendo importantes na eliminação das ROS em excesso.

Apesar de não se observarem diferenças significativas nas atividades de SOD, CAT e GR, verifica-se um aumento significativo na atividade da POD e APX, podendo-se inferir que estas duas enzimas têm um papel ativo na remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e daí os seus níveis baixos nas células e a não existência de danos oxidativos.

Dado que a POD atua em diversos substratos para além do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, logo também se pode associar a sua ativação ao aumento da concentração dos compostos fenólicos verificado, no sentido de responder à sua utilização por esta enzima, de modo a reduzir o impacto da toxicidade do Pb.

A APX por apresentar uma elevada afinidade para o substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, parece ser a enzima mais relevante na remoção desta ROS, sendo uma enzima crucial na conversão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O, usando o ascorbato como dador específico de eletrões. Nestas condições de ensaio, o aumento significativo na atividade da APX é acompanhado por um aumento no teor de ASA, provavelmente porque esta enzima está a produzir de forma rápida e continuada este metabolito.

Uma vez que o ASA também pode ser um substrato da POD, a combinação da ação entre compostos fenólicos/ASA/POD resulta num sistema antioxidante muito eficiente (**Figura 6.33-a**).

Nas plantas contaminadas com 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> sem adição de corretivos, não se observam diferenças significativas nos teores de clorofila a e total, havendo um aumento nos teores de clorofila b, comparativamente às plantas controle. Tal como para a concentração mais baixa,



estes resultados indicam que não existem danos nos pigmentos fotossintéticos nas plantas de alface expostas a 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup>.

Embora a concentração de compostos fenólicos e antocianinas aumente de forma significativa, relativamente ao controlo, a atividade da PAL diminui significativamente. Existe esta indução da produção de compostos fenólicos e de antocianinas, que são fundamentais na sequestração de metais e/ou eliminação das ROS.

Tanto a capacidade antioxidante total como a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX aumentam de forma significativa, não se observando diferenças significativas na atividade da GR. Assim, a SOD atua na conversão do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sendo este H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em excesso posteriormente eliminado pela CAT e APX, uma vez que há um aumento significativo na atividade destas enzimas, comparativamente ao controlo. Estas enzimas são cruciais na conversão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O. No caso da APX, é utilizado o ascorbato como dador específico de eletrões e, provavelmente, por este motivo, há um aumento da produção deste metabolito no sentido de responder à sua utilização por esta enzima (**Figura 6.33-a**).

As plantas contaminadas com 150 mg Pb kg<sup>-1</sup> sem adição de corretivos, não apresentam danos oxidativos havendo um controlo dos níveis de stresse por uma resposta intrínseca da planta. Esta resposta consiste na ativação das enzimas POD e APX, aliada à ativação do metabolismo secundário: PAL/compostos fenólicos/antocianinas. Neste caso, a combinação da ação dos compostos fenólicos/ASA/POD também poderá estar a formar um sistema antioxidante eficaz.

Nas plantas contaminadas com 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> sem adição de corretivos, a SOD, CAT e APX aparentemente estão envolvidas na resposta ao stresse induzido por estas condições de ensaio, demonstrando o eficiente sistema antioxidante da planta de alface, o que é confirmado pela ausência de peroxidação lipídica. Neste caso, há também a produção de compostos fenólicos e de antocianinas, que são fundamentais no controlo dos níveis das ROS nas células.

### **Solos com adição de cortiça (SC)**

Nas plantas contaminadas com 150 mg Pb kg<sup>-1</sup> com adição de cortiça, verifica-se o aparecimento de um aumento significativo na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de MDA, indicando que existe stresse oxidativo e peroxidação lipídica, comparativamente às plantas controlo.



Não existem indícios de danos nos pigmentos fotossintéticos, uma vez que existe um aumento da concentração de clorofilas. Não existe diferenças significativas na atividade antioxidante, atividade enzimática da PAL nem no teor de compostos fenólicos, em relação às plantas controle. No entanto, existe uma estimulação significativa da produção de antocianinas.

Existe uma indução significativa na atividade da GR, bem como um aumento significativo no teor de ASA. Esta enzima, hipoteticamente, está a originar GSH que é rapidamente convertida em GSSG.

Este aumento da atividade da GR pode estar relacionado com o aumento dos níveis de ASA, uma vez que na obtenção da GSH, na reação catalisada pela DHAR, origina-se ASA. Este aumento no teor de ASA pode indicar um papel relevante deste metabolito em tentar manter os níveis de  $H_2O_2$  produzido em excesso devido ao stresse induzido por estas condições de ensaio (**Figura 6.33-b**).

Nas plantas expostas a 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> com adição de cortiça, verifica-se que há um aumento significativo da concentração de MDA, indicando que existe peroxidação lipídica. No entanto, não se observam diferenças significativas nos teores de  $H_2O_2$ , comparativamente às plantas controle, sugerindo que existe a ativação de enzimas ou metabolitos antioxidantes que atuam neste substrato e que reduzem o seu teor nas células.

Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, tal como para a concentração mais baixa, não existem indícios de danos nos pigmentos fotossintéticos, uma vez que existe um aumento da concentração de clorofila a, b e total, relativamente às plantas controle. Tal como para a concentração mais baixa de Pb, apesar de não existirem diferenças significativas na atividade antioxidante, indicando que os níveis de atividade antioxidante são baixos, observa-se um aumento na atividade da PAL que resulta na produção significativa de antocianinas evidenciando que estes pigmentos atuam como importantes compostos antioxidantes na defesa da planta. No entanto, não existem diferenças significativas no teor de compostos fenólicos.

Nos mecanismos antioxidantes enzimáticos existe apenas um aumento significativo na atividade da GR, bem como no teor de ASA, sendo estes os responsáveis pela defesa da planta face ao stresse oxidativo induzido pelo Pb, tal como ocorre com a menor concentração de chumbo (**Figura 6.33-b**).

Nas plantas expostas a 150 mg Pb kg<sup>-1</sup> com adição de cortiça, a GR é a única enzima ativa, sendo importante na regeneração da GSH, assim como um aumento no teor de ASA que



provavelmente são relevantes na destoxificação de Pb na parte edível. Para além disso, existe o aumento significativo da produção de antocianinas, que são antioxidantes importante na eliminação das ROS. No entanto, esta resposta da planta parece não ser suficiente para evitar o stresse oxidativo e, o consequente, aparecimento de danos oxidativos.

A resposta das plantas contaminadas com 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> com adição de cortiça é muito semelhante à obtida para as plantas contaminadas com 150 mg Pb kg<sup>-1</sup>, sugerindo que existe a ativação de enzimas (GR, PAL) ou metabolitos antioxidantes (ASA, antocianinas) que atuam neste substrato e que influenciam o teor de peróxido nas células mas que não são suficientes para evitar o aparecimento de danos oxidativos.

### **Solos com adição de estrume de cavalo (SE)**

Nas plantas expostas a 150 mg Pb kg<sup>-1</sup> com adição de estrume, não se observam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nem danos oxidativos entre as plantas controlo e as plantas contaminadas. Estes resultados refletem a existência de uma resposta enzimática ou não-enzimática, eficiente, que pode influenciar o nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células, através de ativação de enzimas que atuam neste substrato.

Não se observam diferenças significativas na capacidade antioxidante comparativamente às plantas controlo. Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse não se observam diferenças significativas nas concentrações de clorofila a, b, total, antocianinas e atividade da PAL. Para além disso, o teor de compostos fenólicos diminui relativamente às plantas controlo, evidenciando que nestas condições de ensaio estes parâmetros não são afetados na resposta ao stresse.

Existe um aumento significativo nas atividades da SOD e CAT, não estando as outras enzimas envolvidas na resposta ao stresse oxidativo desencadeado por estas condições de ensaio. A presença desta concentração de Pb leva à inativação da GR e APX e não existem diferenças significativas na atividade da POD.

A SOD vai atuar na eliminação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em excesso proveniente da atividade da SOD é posteriormente eliminado pela CAT. Para além disso, a concentração de ASA aumenta significativamente, evidenciando que este metabolito poderá também estar a atuar isoladamente como antioxidante (**Figura 6.33-c**).





Nas plantas contaminadas com 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> com adição de estrume, os teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA aumentam significativamente relativamente às plantas controlo, ou seja, há a indicação de stresse oxidativo que desencadeia um aumento da peroxidação dos lípidos.

Tal como se verifica para a concentração mais baixa, não existem danos nos pigmentos fotossintéticos, existindo um aumento da concentração de clorofila a, b e total, comparativamente às plantas controlo sem adição de corretivos. Apesar de não se verificarem diferenças significativas na atividade antioxidante, nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse observa-se um aumento significativo na atividade da PAL, teor de polifenóis totais e na concentração de antocianinas. Isto evidencia que este nível de stresse ativa reações secundárias, nomeadamente a produção de compostos fenólicos e das antocianinas, que atuam também como antioxidantes.

Nestas condições de ensaio, ocorre o aumento da atividade da SOD e CAT, bem como o aumento significativo da concentração de ASA, tal como verificado para as plantas contaminadas com a menor concentração de chumbo (**Figura 6.33-c**).

A SOD, CAT e ASA aparentemente estão envolvidas na resposta ao stresse induzido por estas condições de ensaio (150 mg Pb kg<sup>-1</sup>, com adição de estrume), controlando de forma eficiente os níveis das ROS formadas, o que é confirmado pela ausência de danos nas membranas.

Nas plantas contaminadas com 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup>, com adição de estrume, existe a ativação do metabolismo secundário, com o aumento na atividade da PAL, produção de compostos fenólicos e síntese de antocianinas. Para além disso, existe exatamente o mesmo comportamento observado para as enzimas e metabolitos antioxidantes com concentração mais baixa de chumbo. No entanto, a exposição a uma concentração superior de Pb, nestas condições de ensaio, já leva ao aparecimento de danos oxidativos nas células devido ao aumento da produção das ROS.

A adição de uma concentração mais elevada de Pb aos solos (1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> solo, sem adição de corretivos) não tem impacto no aparecimento de danos oxidativos, evidenciando que existe uma resposta eficiente da planta face ao stresse, como a ativação da SOD, CAT, ASA e síntese de compostos fenólicos e antocianinas. Nas restantes modalidades já existe peroxidação lipídica por não se conseguir controlar os níveis das ROS presentes, provavelmente porque existe uma ligeira acumulação superior de Pb. No caso da modalidade SE, a resposta é muito semelhante à verificada para a modalidade S. Na modalidade SC, o tipo de resposta é semelhante ao que a planta tem quando estão presentes quantidades mais



baixas de contaminante. As plantas que cresceram num meio onde se adiciona cortiça são as que apresentam mais danos, seguidas das plantas com adição de estrume. Neste caso, a adição deste tipo de corretivos não parece vantajosa. Tem de se ter em consideração que outros mecanismos, que não foram determinados no presente estudo, podem estar a atuar na defesa da planta face ao stresse e que permitiriam fazer uma análise mais completa da resposta da planta.

#### 6.4.3.6. Avaliação da toxicidade induzida por Pb

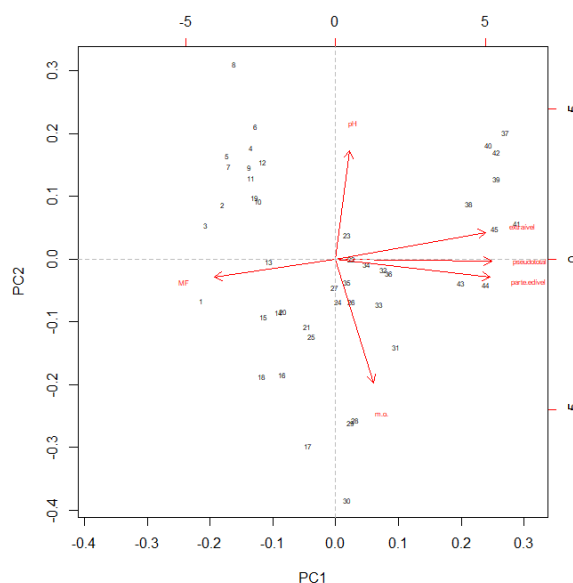
Na **Tabela 6.24** encontram-se os resultados para o Índice de Tolerância (IT) da parte edível das plantas de alface contaminadas com chumbo que se desenvolveram em solo, com e sem adição de corretivos.

**Tabela 6.24** – Índice de tolerância da parte edível, de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Pb e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

Modalidade	IT (%)				
	[Pb] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	150	300	600	1200
S	100	87,04	93,54	82,90	60,93
SC	100	100,78	79,70	73,23	71,14
SE	100	99,29	98,76	97,05	75,42

O IT diminui ligeiramente com o aumento da concentração de Pb presente na parte edível da alface, mas nunca é inferior a 50 % para nenhuma das plantas contaminadas. As plantas expostas a 1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> são as que apresentam valores de IT menores, sendo este valor menor para a modalidade S, seguido da SC e da SE, ao contrário do que seria de esperar.

Para se avaliar a relação entre as variáveis estudadas realizou-se uma análise em componentes principais (ACP) (**Figura 6.34**). Nesta análise considerou-se 6 variáveis: parte edível (corresponde à concentração de Pb na parte edível, mg kg<sup>-1</sup> MS), pseudototal (corresponde à concentração de Pb na fração pseudototal, mg kg<sup>-1</sup> MS), extraível (corresponde à concentração de Pb na fração extraível, mg kg<sup>-1</sup> MS), pH, m.o. (matéria orgânica, %) e MF (massa fresca, g).

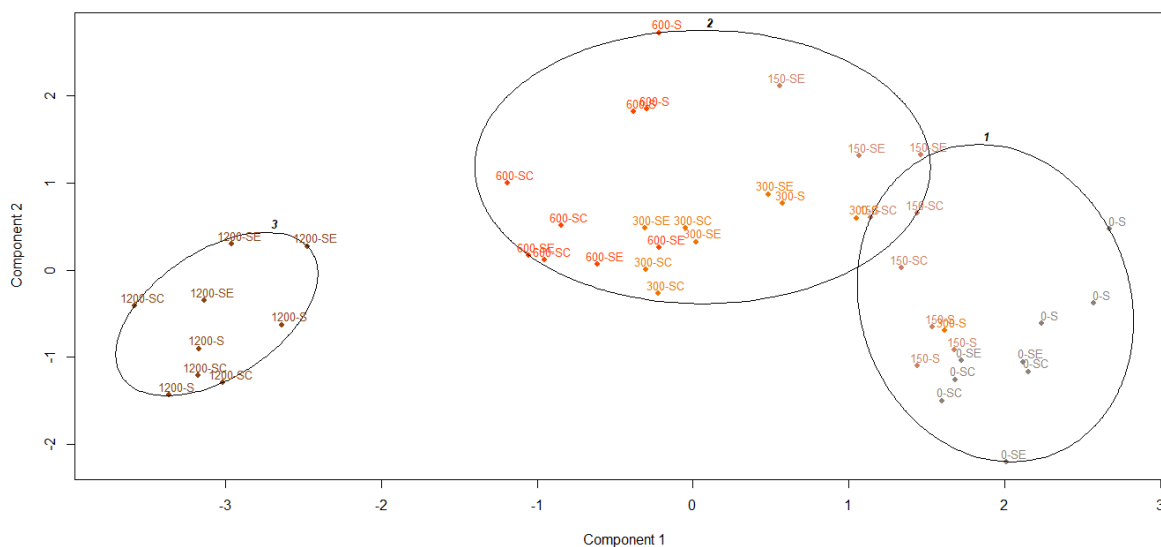


**Figura 6.34** – Análise em componentes principais realizada para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Pb (n=3), considerando 6 variáveis: *parte edível*, *pseudototal*, *extraível*, *pH*, *m.o.* e *MF*.

As variáveis estão representadas a **vermelho**: vetores paralelos, significa que as variáveis estão bem correlacionadas; vetores com o cosseno do ângulo superior a 90° indicam uma má correlação.

Na análise em componentes principais observa-se que as variáveis que correspondem à concentração de Pb presente na fração pseudototal, extraível e na parte edível estão relativamente bem correlacionadas, o que faz sentido, uma vez que uma maior a quantidade de Pb presente na parte edível da planta, reflete uma maior concentração deste elemento no solo (pseudototal e extraível). A variável massa fresca tem um comportamento oposto a estas variáveis, uma vez que o aumento da concentração de Pb na parte edível da alface influencia o tamanho da planta, levando a uma diminuição ligeira da massa fresca. A variável matéria orgânica e pH estão pouco correlacionadas entre si e com as restantes variáveis em estudo. A ACP é explicada num total de 74,01 % pela relação entre a componente principal 1 e a componente principal 2 (PC1 vs PC2).

Para se avaliar a toxicidade dos EPTs estudados realizou-se uma análise classificatória com o método de partição (PAM) que permitisse separar os indivíduos por classes (**Figura 6.35**), considerando-se as 6 variáveis referidas anteriormente.



**Figura 6.35** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Pb ( $n=3$ ). Estas duas componentes explicam 74,01 % da variabilidade.

Os indivíduos estão apresentados com base na concentração de Pb e na modalidade aplicada (S- sem adição de corretivos; SC- adição de cortiça; SE- adição de estrume).

Na análise classificatória verifica-se que existem duas classes sobrepostas, numa classe encontram-se os indivíduos controlo e os indivíduos menos contaminados (0 e 150 mg Pb kg<sup>-1</sup> (S, SC)) e em sobreposição está outra classe, onde estão os indivíduos contaminados com concentrações intermédias de Pb (150 (SE), 300 e 600 mg Pb kg<sup>-1</sup>). É interessante verificar que os indivíduos mais contaminados (1200 mg Pb kg<sup>-1</sup>) formam uma classe bem distinta das restantes. Esta separação por classes reflete que, efetivamente, é nestes indivíduos mais contaminados que se observam, embora de forma ligeira, os efeitos de toxicidade do Pb, nomeadamente uma diminuição ligeira da massa fresca da planta, uma maior acumulação de Pb e um menor IT.

#### *Conclusões intercalares*

Ao contrário do que seria de esperar, a adição de corretivos orgânicos não teve grande influência na quantidade de Pb presente na fração extraível. A presença destes corretivos origina um aumento nos teores de matéria orgânica, mas sem grande efeito na diminuição do teor de Pb extraível, assim como nos valores de pH dos solos, que se mantêm perto da neutralidade.

Ao contrário do que seria de esperar, as plantas contaminadas com chumbo que se desenvolveram em solos sem a adição de corretivos, apresentam uma quantidade menor de



Pb na parte edível, comparativamente às outras modalidades. Por este motivo, não é possível verificar o efeito da adição de corretivos orgânicos na diminuição de Pb absorvido pela planta.

Nestas condições de ensaio, relativamente aos parâmetros vegetativos, é possível verificar que o efeito do Pb é significativo na diminuição da biomassa da parte edível e no índice de tolerância nas plantas mais contaminadas ( $1200 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ ; S, SC, SE), não se verificando mais nenhuns sintomas visíveis de toxicidade para nenhuma planta contaminada nem modalidade. Os resultados de FT também evidenciam que o Pb é um elemento pouco transferido do solo para a parte edível.

Se considerarmos o teor de Pb presente na parte aérea de todas as plantas contaminadas é possível verificar que os valores obtidos ultrapassam o limite máximo permitido pela legislação em vigor para hortícolas de folha de  $0,30 \text{ mg Pb kg}^{-1}$  MF (Commission Regulation (EU) 1005/2015). É importante referir que as plantas que cresceram num solo com uma contaminação inferior ( $150 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ ) ao valor de referência que corresponde ao valor limite da concentração de chumbo nos solos neutros ( $300 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ ), apresentam risco de contaminação da cadeia alimentar, uma vez que a quantidade acumulada é superior ao limite permitido. Estes resultados podem ser uma preocupação na contaminação da cadeia alimentar, uma vez que as plantas não apresentam sintomas visíveis de toxicidade e acumulam uma quantidade significativa de chumbo na parte edível desta planta alimentar. No entanto, no presente estudo os valores de IDE obtidos para as plantas contaminadas com chumbo, à exceção das plantas contaminadas com  $150 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ , encontram-se acima da dose de referência referida no presente trabalho, podendo haver risco associado à exposição ao chumbo para a saúde do ser humano.

Pode-se concluir que a adição dos corretivos (estrume de cavalo seco e pó de cortiça) nas condições testadas neste trabalho, a solos contaminados com Pb não tem grande influência na diminuição da acumulação de chumbo pela alface.



#### 6.4.4. Níquel

##### 6.4.4.1. Caracterização do solo artificialmente contaminado com Ni

Na **Figura 6.36-a** apresentam-se as medições dos valores pseudototais de Ni no solo que são bastante próximos dos valores nominais (a quantidade teoricamente adicionada). As frações extraíveis, considerando a maior contaminação de níquel, correspondem a 2,34, 2,21 e 2,06 %, do total presente no solo S, SC e SE, respetivamente (**Figura 6.36-b**).

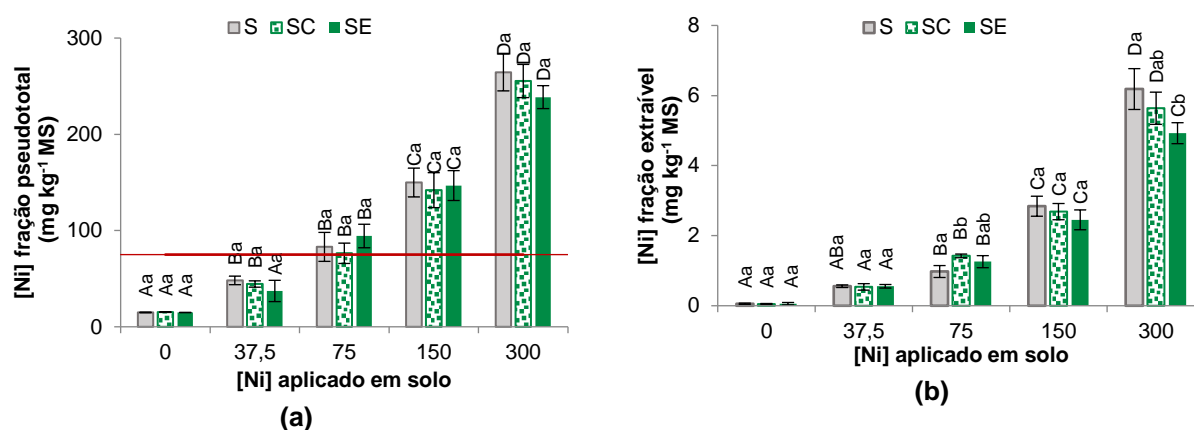
Segundo o Decreto-lei (n.º 276/2009), o valor de referência de Ni em solos neutros, aos quais se pretende adicionar lamas de depuração, é de 75 mg Ni kg<sup>-1</sup>. Se considerarmos solos em que se pretende aplicar matéria fertilizante, o valor é de 50 mg Ni kg<sup>-1</sup> (Decreto-Lei, n.º 103/2015 ). A legislação canadiana define o valor de 130 mg Ni kg<sup>-1</sup> para uso agrícola e a legislação holandesa refere o valor referência é de 35 mg Ni kg<sup>-1</sup> e o valor de intervenção é de 210 mg Ni kg<sup>-1</sup> (Leitão et al., 2016b).

Nos resultados obtidos para a fração extraível há um aumento significativo da concentração de Ni na fração extraível para concentrações superiores a 75 mg Ni kg<sup>-1</sup>, para todas as modalidades em estudo. É possível verificar que nas concentrações mais elevadas de Ni aplicadas no solo (150 e 300 mg Ni kg<sup>-1</sup>), a fração extraível apresenta uma tendência para diminuir com a utilização de corretivos, sendo esta diminuição apenas significativa para as plantas contaminadas com 300 mg Ni kg<sup>-1</sup> na modalidade SE. Estes dados mostram que, aparentemente, a presença destes dois corretivos orgânicos pode ter influência na disponibilidade de Ni no solo para a planta.

Os resultados obtidos para o pH, matéria orgânica, fósforo extraível e potássio extraível encontram-se representados na **Figura 6.37**.

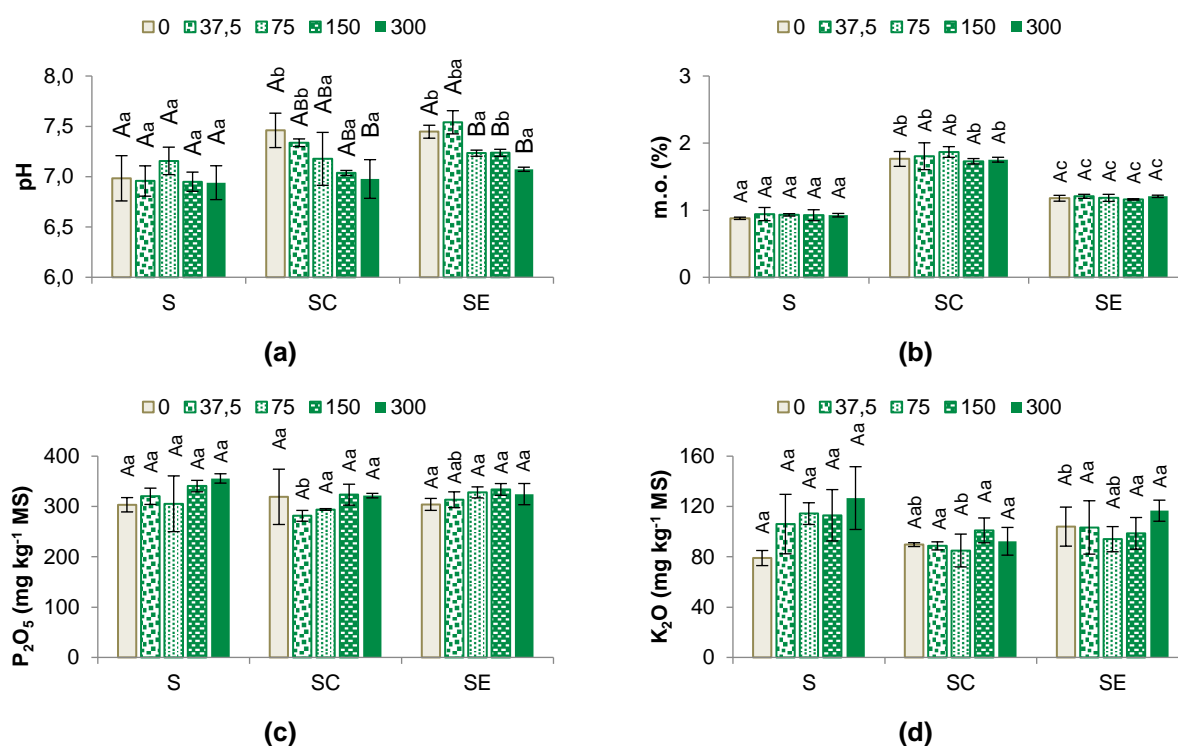
Os resultados obtidos para o pH nos solos sem adição de corretivos não indicam grandes variações entre a amostra controlo e as amostras contaminadas, bem como para as diferentes modalidades, encontrando-se próximos da neutralidade (7,00-7,31) (**Figura 6.37-a**). No caso das modalidades SC e SE, há uma diminuição significativa do pH a partir de 300 e 75 mg Ni kg<sup>-1</sup>, respetivamente.

Os valores de fósforo extraível (**Figura 6.37-c**) e potássio extraível (**Figura 6.37-d**) não indicam grandes diferenças entre a amostra controlo e amostras contaminadas, bem como entre as diferentes modalidades. Os valores de K<sub>2</sub>O encontram-se médios (50-100) a altos (100-200) e os de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> muito elevados (> 200).



**Figura 6.36** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Ni e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) concentração pseudototal de Ni (mg kg<sup>-1</sup> MS) e (b) concentração de Ni na fração extraível (mg kg<sup>-1</sup> MS).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Ni aplicado ( $n=3$ ). A linha **vermelha** representa o valor máximo de Ni que pode estar presente nos solos (75 mg Ni kg<sup>-1</sup>).



**Figura 6.37** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Ni e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) pH, (b) matéria orgânica (%), (c) fósforo extraível (mg kg<sup>-1</sup> MS) e (d) potássio extraível (mg kg<sup>-1</sup> MS).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Ni aplicado ( $n=3$ ).





Como seria de esperar, a adição destes corretivos orgânicos aumenta o teor de matéria orgânica nos solos onde são adicionados, comparativamente a um solo sem adição de corretivos, existindo um aumento significativo do teor de m.o. nos solos SC e SE, relativamente aos solos S (**Figura 6.37-b**), não se verificando diferenças significativas entre as amostras controlo e contaminadas. Se observarmos os resultados obtidos para a concentração de Ni na fração extraível em solos contaminados com  $300 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ , verifica-se que esta diminui comparativamente ao solo sem adição de corretivos. Uma explicação possível é que efetivamente os solos onde são adicionados corretivos apresentam um teor de m.o. superior ao solo sem adição de corretivos, o que pode levar à imobilização de Ni através de reações de adsorção, conduzindo ao aumento da retenção de Ni minimizando a sua biodisponibilidade.

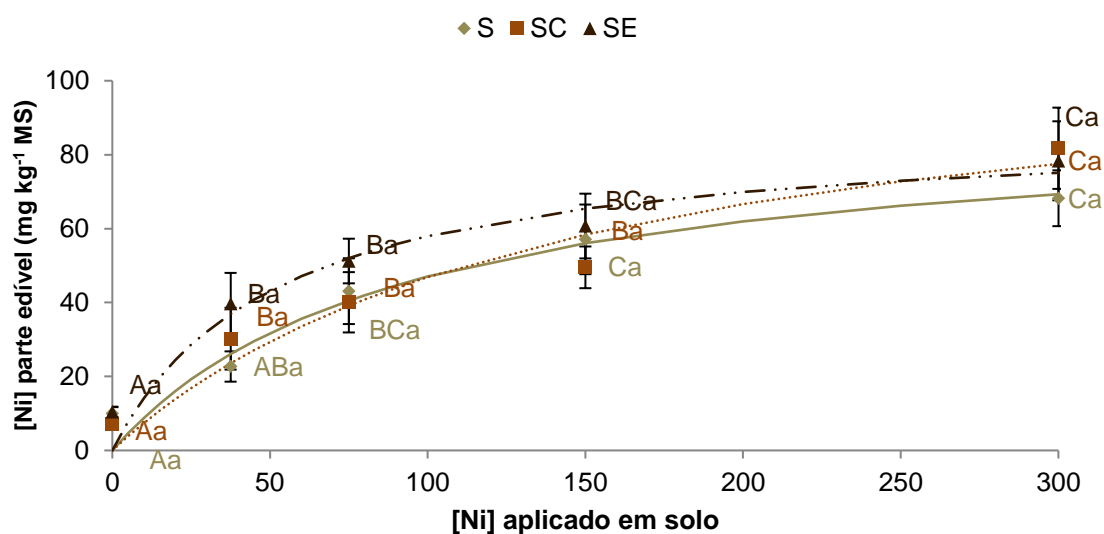
#### 6.4.4.2. Caracterização da acumulação de Ni em alface

O comportamento da acumulação de Ni, na parte edível da alface M4E, em função da concentração de Ni aplicado em solo, para as diferentes modalidades em estudo, encontra-se apresentado na **Figura 6.38**.

À medida que se aumenta a concentração de Ni presente no solo, a planta tem capacidade para acumular uma maior quantidade deste elemento na parte edível, sendo possível verificar diferenças significativas, em relação ao controlo, para concentrações superiores a  $37,5 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ , para SC e SE, e  $50 \text{ mg Ni kg}^{-1}$  para a modalidade sem adição de corretivos. A acumulação de Ni é crescente e tende para um patamar de saturação, uma vez que não existem diferenças significativas entre plantas expostas a  $150$  e  $300 \text{ mg Ni kg}^{-1}$  para as modalidades S e SE, estando perto de se atingir valores de saturação.

À acumulação de Ni foi ajustado o modelo hiperbólico. Estes ajustes estão representados pelas linhas das **Figura 6.38**, onde também se apresentam os parâmetros desse ajuste. Nestas condições de ensaio, verifica-se que existe um ajuste razoável ao modelo hiperbólico, tal como indicam os valores de  $R^2$  obtidos ( $> 0,94$ ).

O coeficiente  $C_{\text{máx}}$ , que representa o patamar de concentração máxima de Ni absorvido pela planta é relativamente próximo para cada uma das modalidades, isto é concordante com o facto de não existirem diferenças significativas no teor de Ni acumulado na parte edível, entre cada uma das modalidades.



dias	C <sub>máx</sub>	K <sub>Ni</sub>	R <sup>2</sup>	Linha
S	90,81	93,09	0,9476	—
SC	115,23	145,97	0,9351	.....
SE	88,15	52,12	0,9419	- - -

**Figura 6.38** – Concentração de Ni ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 37,5, 75, 150 e 300  $\text{mg Ni kg}^{-1}$ , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controle e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Ni aplicado ( $n=3$ ).

Alguns estudos têm sido efetuados em plantas alimentares que se desenvolveram em solos contaminados com Ni. Khan et al. (2010) observaram que a alface acumulou Ni ( $11,00 \pm 0,65 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ ) em solos contaminados ( $57,0 \pm 10,0$ - $24,0 \pm 11,0 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ ), mas os valores estavam dentro dos limites estabelecidos pela China (SEPA), Índia e União Europeia, segundo os critérios referidos pelos autores.

Num estudo anterior realizado por Khan et al. (2008b), os autores também determinaram concentrações de metais pesados nas partes edíveis de plantas alimentares cultivadas em solos irrigados com águas residuais ( $24,90 \pm 0,56 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ ), por comparação com hortícolas cultivados em solos de referência e compararam com os limites estabelecidos na China. As concentrações de Ni foram significativamente maiores ( $10$ - $20 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ ), principalmente para *Lactuca sativa* e plantas de *Raphanus sativus*, *Zea mays*, *Brassica juncea*, *Brassica oleracea*, *Brassica napus*, excedendo o limite recomendado ( $10 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ ).



Harasim e Filipek (2015) fazem referência que a absorção de Ni pela planta é influenciada pelo pH do solo, referindo que a concentração de Ni diminui com o aumento do pH como consequência de uma diminuição da sua biodisponibilidade. Os mesmos autores referem que a disponibilidade de Ni também é afetada com o tipo de solo, fazendo referência a um estudo em que as plantas que cresceram em solos ricos em matéria orgânica tinham uma biodisponibilidade menor do que em solos arenosos ou argilosos. Estas diferenças são atribuídas à forte ligação do Ni à matéria orgânica sob condições experimentais com solos ácidos. No presente estudo, o teor de m.o. também deve ter alguma influência na disponibilidade de Ni presente (**Figura 6.37-b**), no entanto, não existem diferenças significativas na absorção de Ni pela planta onde se adicionam diferentes corretivos orgânicos (**Figura 6.38**).

A adição de corretivos orgânicos não causa uma diminuição do Ni absorvido pelas plantas. A adição de estrume e de cortiça provocam um aumento na acumulação de Ni, em comparação com a situação sem corretivo, de 10,6 % e 13,4 %, respetivamente.

Alguns estudos sobre a aplicação eficaz de corretivos orgânicos a solos contaminados com Ni têm sido referidos em bibliografia (Aziz et al., 2017; Rehman et al., 2016; Shaheen et al., 2017) (Méndez et al., 2014; Shen et al., 2016; Younis et al., 2015).

O teor de Ni presente na parte edível de plantas expostas a  $37,5 \text{ mg Ni kg}^{-1}$  ( $22,70 \pm 4,10 \text{ mg Ni kg}^{-1} \text{ MS (S)}$ ,  $30,23 \pm 8,36 \text{ mg Ni kg}^{-1} \text{ MS (SC)}$  e  $39,70 \pm 8,32 \text{ mg Ni kg}^{-1} \text{ MS (SE)}$ ) e em plantas contaminadas com  $300 \text{ mg Ni kg}^{-1}$  ( $68,22 \pm 7,56 \text{ mg Ni kg}^{-1} \text{ MS (S)}$ ,  $81,74 \pm 10,99 \text{ mg Ni kg}^{-1} \text{ MS (SC)}$  e  $78,35 \pm 10,68 \text{ mg Ni kg}^{-1} \text{ MF (SE)}$ ), encontram-se, acima dos valores normais presentes em hortícolas referido por Nagajyoti et al. (2010) (inferiores a  $1,0 \text{ mg Ni kg}^{-1} \text{ MS}$ ) e no intervalo referido por Varennes (2003) (entre  $1\text{-}10 \text{ mg Ni kg}^{-1} \text{ MS}$ ).

Na **Tabela 6.25** estão os resultados obtidos para o fator de transferência do solo que permitem verificar a capacidade que as plantas de alface têm em transferir o Ni presente no solo para a sua parte edível, sendo um fator para controlar a exposição humana aos EPTs através da cadeia alimentar.

Existe uma ligeira diminuição do fator de transferência obtido para o Ni, nas plantas contaminadas sem e com adição de corretivos, com o aumento da concentração de níquel presente no solo. A capacidade da planta em transferir o Ni para a sua parte edível pode depender da quantidade de Ni presente no solo. Os valores obtidos de FT indicam que o Ni, presente no solo, por ser um elemento essencial é facilmente transferível para a parte aérea da planta, tal como verificado no **Capítulo IV**.



**Tabela 6.25** – Fator de transferência do solo para a alface M4E que se desenvolveu em solo, sujeita a diferentes concentrações de Ni e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

Modalidade	Fator de transferência (FT)				
	[Ni] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	37,5	75	100	300
S	0,67	0,47	0,52	0,38	0,26
SC	0,47	0,68	0,52	0,35	0,32
SE	0,70	1,07	0,54	0,41	0,33

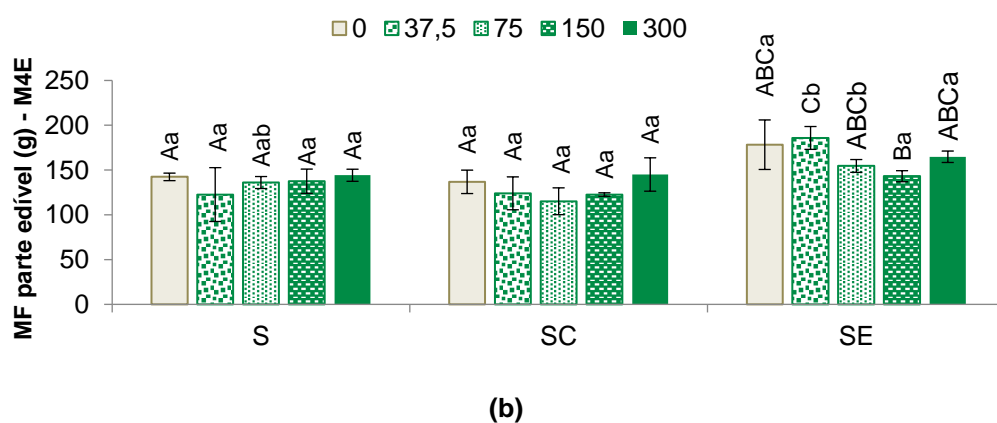
Estes resultados também estão concordantes com os obtidos para a acumulação de níquel em cada modalidade (**Figura 6.38**), indicando que a adição de cortiça ou estrume de cavalo no solo, provavelmente, não afeta a capacidade da planta em transferir o níquel presente no solo para a parte edível da planta.

Outros autores também obtiveram valores de FT semelhantes aos obtidos neste estudo em alface de 0,19 para uma concentração que variou entre 24,0±11,0-57,0±10,0 mg Ni kg<sup>-1</sup> solo (Khan et al., 2010), <0,5 para uma concentração que variou entre 1969,0±89,0-760,0±18,0 mg Ni kg<sup>-1</sup> solo (Malandrino et al., 2011) e noutras plantas como milho (0,56), trigo (0,63), arroz (0,45) e batata (0,13) (Khan et al., 2013); couve (0,03), batata (0,01), cebola (0,02) e tomate (0,01) (Gebrekidan et al., 2013). Amin et al. (2013) reportou valores relativamente mais elevados em tomate (9,0) e cebola (1,0).

#### 6.4.4.3. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade

Na **Figura 6.39** encontram-se os resultados obtidos para a massa fresca da parte aérea e o registo fotográfico para as plantas de alface M4E para cada modalidade e com diferentes concentrações de níquel no solo.

Não se observam indícios de toxicidade em nenhuma planta contaminada com níquel, apesar da acumulação significativa de Ni verificada, isto mostra que as concentrações de Ni utilizadas que não foram suficientes, apesar de muito elevadas, para induzir uma resposta maior na planta (**Figura 6.39-a**).



**Figura 6.39** – Massa fresca da parte edível (a) e o registo fotográfico (b) de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo contaminado com Ni e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Ni aplicado ( $n=3$ ).



Apesar de a acumulação significativa de Ni na parte aérea (**Figura 6.38**), é possível observar que não existem diferenças significativas na massa fresca da parte edível entre plantas contaminadas com diferentes concentrações de níquel e as plantas controle, para as três modalidades em estudo (S, SC e SE) (**Figura 6.39-b**). Os valores percentuais de diminuição da biomassa das plantas contaminadas com a maior concentração de níquel, comparativamente às plantas controle, correspondem a 7,5 %, para a modalidade SE, e a um aumento de 1,3 e 6,0 %, nas modalidades S e SC, respetivamente.

#### 6.4.4.4. Avaliação do risco associado à ingestão de Ni

Na **Tabela 6.26** e **6.27** encontram-se os resultados obtidos para a ingestão diária estimada de Ni através do consumo de alface e os valores dos parâmetros de avaliação do risco de Ni na saúde dos seres humanos, respetivamente.

**Tabela 6.26** – Ingestão diária estimada, da parte edível de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Ni e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

Modalidade	IDE (mg dia <sup>-1</sup> )*				
	[Ni] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	37,5	75	100	300
S	0,107	0,243	0,462	0,612	0,731
SC	0,077	0,324	0,429	0,531	0,876
SE	0,111	0,425	0,549	0,650	0,840

\*considerando o valor médio de ingestão média diária de alface de 22,5 g dia<sup>-1</sup> para adultos (WHO, 2003).

A ingestão média diária de alface é de 22,5 g dia<sup>-1</sup> para adultos (WHO, 2003) e considera-se um teor médio de humidade nas plantas de alface de 97,9 %. Através dos dados obtidos no presente trabalho é possível verificar que a ingestão diária de Ni estimada varia entre 0,731 e 0,876 mg dia<sup>-1</sup>, considerando o caso mais grave de contaminação (300 mg Ni kg<sup>-1</sup>). No caso das plantas contaminadas com 37,5 mg Ni kg<sup>-1</sup>, os valores variam entre 0,243 e 0,425 mg dia<sup>-1</sup>.

De acordo com os dados obtidos, considerando um homem adulto de 70 kg, a ingestão diária de Ni estimada varia entre 10,44-12,51 µg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (considerando o caso mais grave de contaminação) e entre 3,47-6,08 µg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (considerando o caso menos grave de contaminação).





**Tabela 6.27** – Parâmetros de avaliação do risco associado à exposição ao Ni para a saúde do ser humano.

Parâmetros de avaliação do risco	Valores referência obtidos para o Ni	Referências Bibliográficas
<i>RfD</i>	5 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ 20 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	(Hough et al., 2004b) (EFSA, 2015)
<i>TDI</i>	2,8 $\mu\text{g}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	(EFSA, 2015)
MRL	0,2 $\mu\text{g Ni m}^{-3}$	(EFSA, 2015)
<i>NOAEL</i>	5 $\text{mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$	(EFSA, 2015)

- *RfD* - dose de referência ou dose oral máxima aceitável de uma substância, que provavelmente não terá risco significativo de efeitos nocivos durante a vida.

- *TDI* – (do inglês, *Tolerable Daily Intake*) - ingestão diária tolerável de uma substância potencialmente nociva ou contaminante de alimentos que pode ser ingerida ao longo da vida sem risco de efeitos adversos para a saúde.

- *MRL* - nível mínimo de risco, devido à exposição crônica por via oral, sem haver risco de efeitos adversos para a saúde.

- *NOAEL* (do inglês, *No Observed Adverse Effect Level*) - concentração ou quantidade máxima de substância, que não causa efeito adverso num organismo vivo.

Segundo os valores definidos pela EFSA (2015), relativamente à dose de referência ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) é possível verificar que todos os valores obtidos estão abaixo desse valor, não constituindo um risco adverso associado. No caso do *TDI* ( $2,8 \mu\text{g}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) (EFSA, 2015) é possível verificar que, todos os valores estão acima deste valor de referência. No caso do *NOAEL* ( $5 \text{mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) (EFSA, 2015), todos os valores obtidos são inferiores.

Alguns autores verificaram que existe um risco associado à ingestão de vegetais de folha, como a alface, cultivados em solos contaminados com Ni (Singh et al., 2010a; Yeganeh et al., 2013a), enquanto outros estudos fazem referência que os teores de Ni presentes em hortícolas estavam dentro dos níveis de segurança para consumo humano (Khan et al., 2010; Li et al., 2015a). Khan et al. (2010) fizeram referência a um valor de ingestão diária através do consumo de alface contaminada com Ni de  $0,0042 \text{mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (adulto) e  $0,0063 \text{mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (criança). Os autores verificaram que a ingestão diária de Ni foi inferior ao limite *RfD*.

Nos seres humanos, após a ingestão, a biodisponibilidade de Ni depende da forma química, solubilidade, veículo de administração e estado de jejum do indivíduo. A absorção de Ni através do trato gastrointestinal pode variar significativamente (1 a 40 %). Em particular, observou-se uma menor absorção quando a exposição ocorreu na presença de alimentos, comparativamente à administração com água potável na ausência de alimentos ou em estado de jejum. O Ni absorvido pode-se ligar às proteínas séricas e assim, ser amplamente distribuído pelo organismo. O Ni absorvido é excretado principalmente através da urina e, em





menor medida, pelo leite materno. O Ni que não é absorvido é excretado pelas fezes. O tempo de semi-vida estimado no corpo humano do Ni é de  $28 \pm 9$  horas (EFSA, 2015).

#### 6.4.4.5. Caracterização da resposta da planta

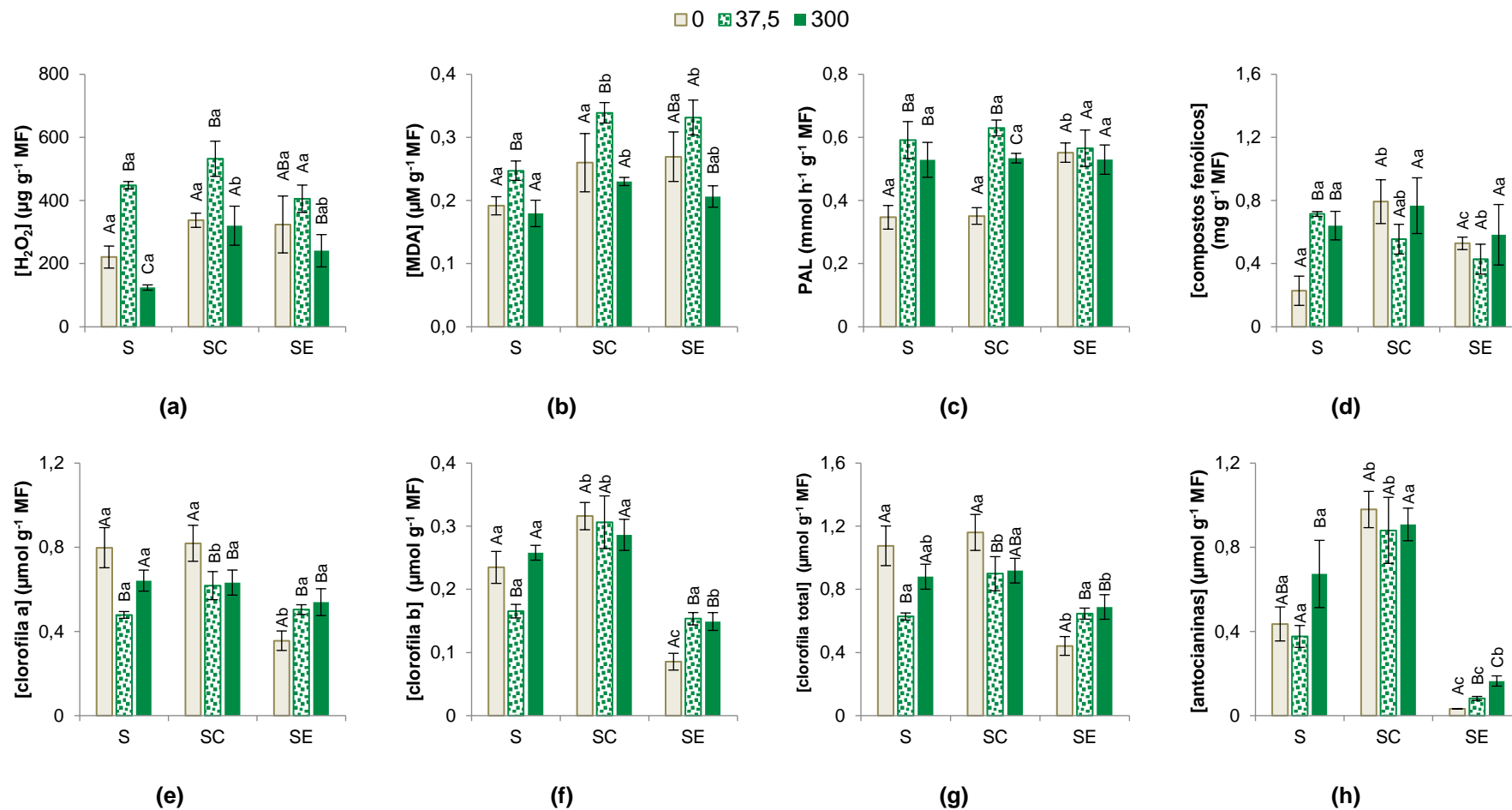
A caracterização da resposta da planta de alface é feita tendo por base os resultados apresentados nas **Figuras 6.40 e 6.41**. Na **Figura 6.42** encontra-se uma representação esquemática da resposta antioxidante da planta de alface submetida a estas condições de ensaio.

#### Solos sem adição de corretivos (S)

Nas plantas contaminadas com  $37,5 \text{ mg Ni kg}^{-1}$  sem adição de corretivos, apesar do Ni não conseguir originar diretamente ROS por ser um metal não-redox, observa-se um aumento significativo dos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , indicando a existência de stresse oxidativo que resulta no aparecimento de danos oxidativos nas células, uma vez que os teores de MDA também aumentam significativamente, relativamente ao controlo.

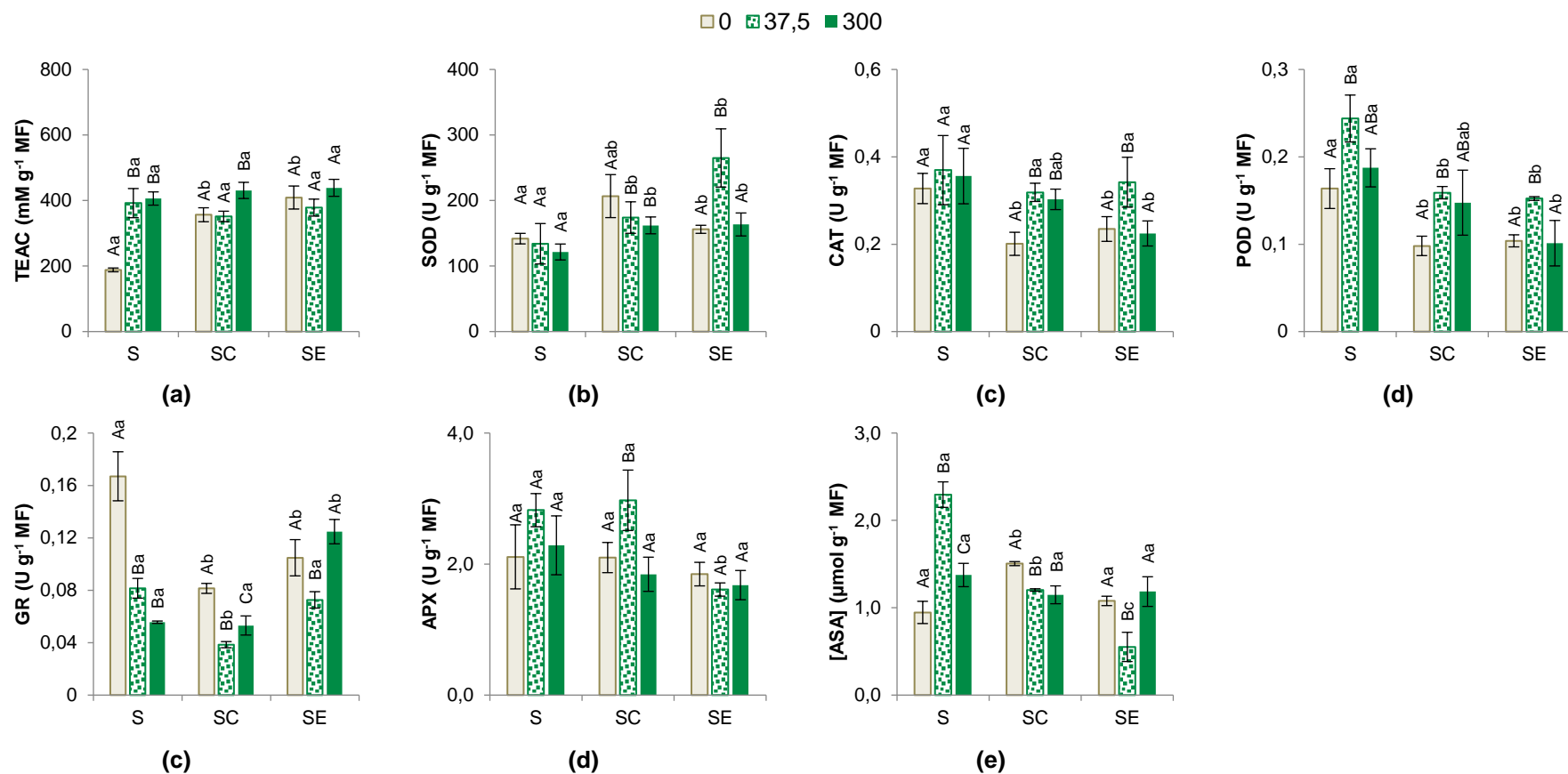
A capacidade antioxidante aumenta de forma significativa em relação ao controlo, indicando que uma resposta antioxidante está ativa. Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, observa-se uma diminuição no teor de clorofila a, b e total em plantas contaminadas comparativamente ao controlo, indicando o aparecimento de cloroses. Estes sintomas não foram observados visualmente (**Figura 6.39-a**). Um aumento significativo na atividade da PAL resulta na produção significativa de compostos fenólicos e de antocianinas.

A POD está ativa na remoção do excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  uma vez que ocorre uma indução da sua atividade enzimática, promovida pela presença de Ni, sendo significativamente superior ao controlo. Este aumento da atividade da POD também pode estar diretamente relacionado com o aumento da produção de compostos fenólicos, uma vez que a POD atua em diversos substratos para além do peróxido de hidrogénio, podendo-se associar a sua ativação ao aumento da concentração destes compostos.



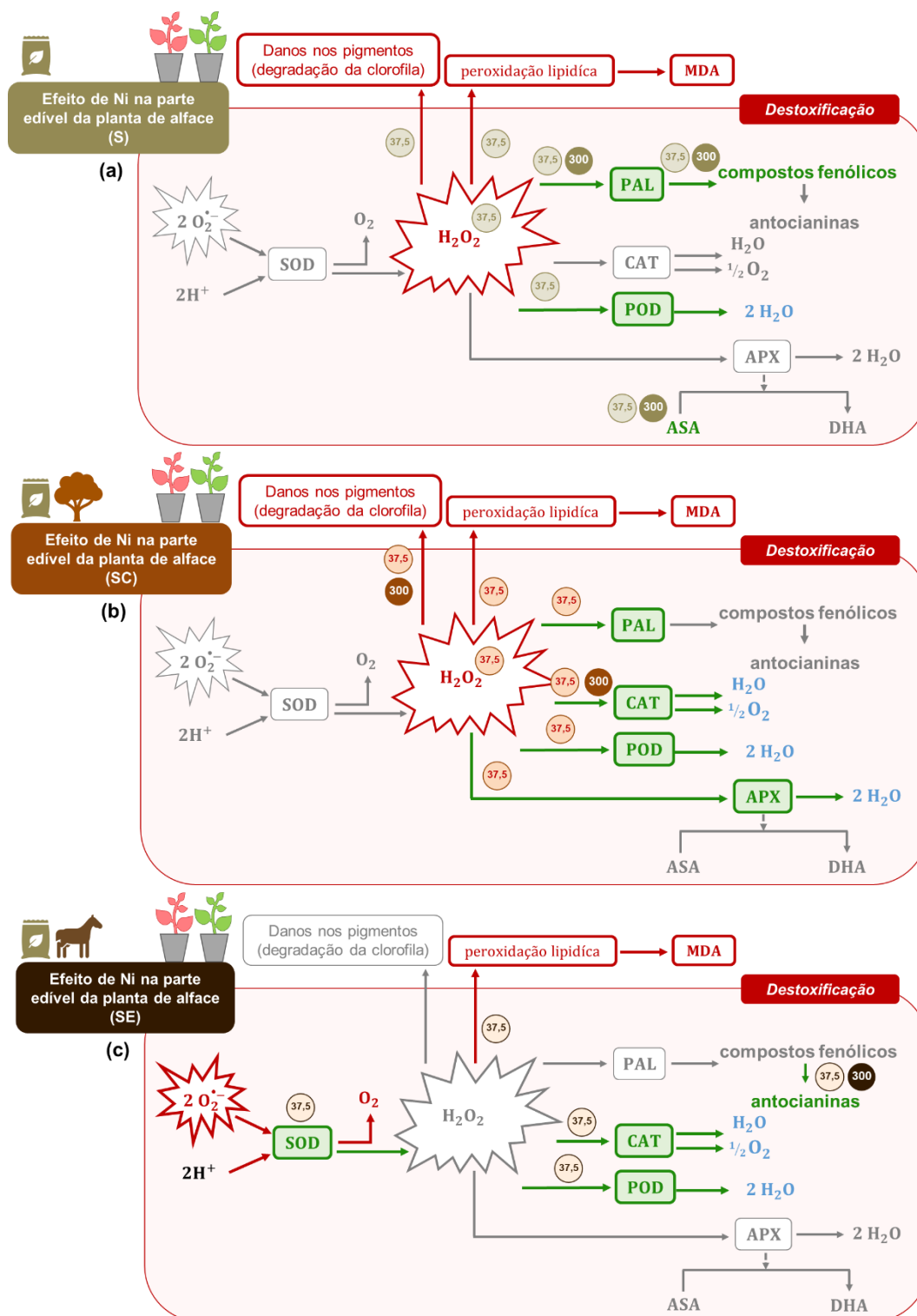
**Figura 6.40** – Parâmetros indicadores de stresse oxidativo (a) e danos nas membranas (b) e parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (c, d, e, f, g, h) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 37,5 e 300 mg Ni kg<sup>-1</sup>, com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controle e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Ni aplicado ( $n=3$ ).



**Figura 6.41** – Atividade antioxidante total (a), enzimas antioxidantes (b,c,d,e,f) e metabolitos antioxidantes (g) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 37,5 e 300 mg Ni kg<sup>-1</sup>, com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controle e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Ni aplicado ( $n=3$ ).



**Figura 6.42** – Representação esquemática da resposta antioxidante de alfaca M4E contaminada com 37,5 e 300 mg Ni kg<sup>-1</sup> e sujeita a diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

A **verde** estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a **vermelho** os compostos ou reações que são adversos; a **cinza** os mecanismos de defesa ou reações inativas; a **azul** os compostos formados que não são prejudiciais.



A concentração de ASA aumenta significativamente, parecendo indicar que este metabolito antioxidante é crucial na defesa da planta para neutralizar os efeitos adversos do Ni (**Figura 6.42-a**).

Nas plantas contaminadas com 300 mg Ni kg<sup>-1</sup> sem adição de corretivos, não se verifica a presença de peroxidação lipídica, uma vez que não existem diferenças significativas na concentração de MDA e existe uma diminuição do teor de peróxido. Estes resultados indicam que provavelmente poderá estar a atuar mecanismos de resposta antioxidantes eficazes.

A capacidade antioxidante aumenta nas plantas contaminadas que se desenvolveram nestas condições experimentais. Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, não se observam diferenças significativas nos teores de clorofila a, b e total nem de antocianinas. Com esta concentração também se verifica a ativação da PAL, com o consequente aumento da produção de compostos fenólicos, que são efetivos na eliminação das ROS e, por isso, os níveis de peróxido de hidrogénio estão baixos nas células.

Não se verifica o aumento da atividade de nenhuma enzima antioxidante, não se observando diferenças significativas, comparativamente às plantas controlo. No caso da GR existe inclusivamente uma diminuição na sua atividade.

O aumento da síntese de ASA que pode estar relacionado com a manutenção dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estando o ascorbato a atuar como antioxidante isolado, eliminando as ROS produzidas em excesso devido ao stresse induzido pelo níquel (**Figura 6.42-a**).

Nas plantas contaminadas com 37,5 mg Ni kg<sup>-1</sup> sem adição de corretivos, a resposta da planta desencadeia uma rápida produção das ROS, seguida pela ativação de reações secundárias de defesa, como a produção de compostos fenólicos. Os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tentam ser controlados pela combinação da ação dos compostos fenólicos/ASA/POD. No entanto, estes mecanismos não são suficientes para prevenir a ocorrência de danos oxidativos nos lípidos e o aparecimento de cloroses.

Nas plantas contaminadas com uma concentração superior de níquel, sem adição de corretivos, a síntese de compostos fenólicos e o ASA parecem ser suficientes em manter os níveis de peróxido de hidrogénio baixos nas células, assim como prevenir o aparecimento de danos oxidativos nas células.



### Solos com adição de cortiça (SC)

Nas plantas contaminadas com 37,5 mg Ni kg<sup>-1</sup> com adição de cortiça, verifica-se o mesmo comportamento observado para esta concentração de Ni na modalidade sem adição de corretivos, relativamente aos parâmetros de indicação de stresse oxidativo e danos nas membranas.

Não se observam diferenças significativas na capacidade antioxidante, comparativamente às plantas controlo. Apesar de não se observarem diferenças significativas nos teores de clorofila b, existe uma diminuição significativa no teor de clorofila a e total, indicando a presença de cloroses nas folhas. No entanto, não se observa este sintoma visualmente (**Figura 6.39-a**). Apesar de haver um aumento na atividade da PAL, também não se observam diferenças significativas nos teores de antocianinas nem no teor de compostos fenólicos.

Existe um aumento significativo na atividade da CAT, POD e APX, responsáveis pela remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em excesso e uma diminuição na atividade da SOD e GR, indicando que estas enzimas são inativadas na presença de níquel. A APX é crucial na conversão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O, usando o ascorbato como dador específico de eletrões. Uma vez que APX está a converter o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O consumindo o ASA, isso provoca a sua diminuição significativa. Neste caso, o ASA está a ser consumido a um ritmo mais elevado que o da sua formação. No entanto, esta resposta não é suficiente para evitar o aparecimento de danos oxidativos (**Figura 6.42-b**).

Nas plantas contaminadas com 300 mg Ni kg<sup>-1</sup> com adição de cortiça, não existem diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo e de danos nas membranas, provavelmente, porque está a atuar um eficiente sistema antioxidante na defesa da planta.

A capacidade antioxidante total aumenta significativamente, em relação às plantas controlo, o que reflete um sistema antioxidante ativo. Apesar de não se observarem diferenças significativas nos teores de clorofila b, existe uma diminuição significativa no teor de clorofila a e total (**Figura 6.39-a**). Também não se observam diferenças significativas nos outros parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (PAL, compostos fenólicos, antocianinas).

Existe uma diminuição na atividade da SOD e GR, indicando que estas enzimas são inativadas na presença de níquel. O teor de ASA também diminui de forma significativa, sugerindo que este metabolito não está ativo na defesa da planta ou que está a ser consumido a um ritmo elevado. O excesso de peróxido está a ser rapidamente removido pela atividade



da CAT, daí o aumento significativo na atividade desta enzima e os níveis baixos de peróxido nas células (**Figura 6.42-b**).

A presença de uma baixa concentração de Ni ( $37,5 \text{ mg Ni kg}^{-1}$  com adição de cortiça), induz a presença de danos nos pigmentos e a peroxidação lipídica devido ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  em excesso. Este aumento do nível desta espécie provoca a ativação de enzimas antioxidantes, como a CAT, POD e APX. A elevada atividade enzimática da APX, comparativamente à CAT e POD, sugere que a APX poderá ser uma melhor resposta intrínseca da planta.

Nas plantas expostas a uma concentração superior de níquel, o controlo dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o não aparecimento de danos oxidativos, ocorre, provavelmente, porque está a atuar um eficiente sistema antioxidante na defesa da planta. A elevada atividade enzimática da CAT, sugere que esta enzima é a única resposta intrínseca face ao stress oxidativo induzidos por estas condições experimentais.

### **Solos com adição de estrume de cavalo (SE)**

Nas plantas contaminadas com  $37,5 \text{ mg Ni kg}^{-1}$  com adição de estrume, observa-se um aumento significativo no teor de MDA, que não é acompanhado por um aumento significativo dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , indicando a existência de peroxidação lipídica.

Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse não se observam diferenças significativas nos teores de compostos fenólicos nem na atividade da PAL. A concentração de clorofila a, b e total aumenta de forma significativa evidenciando que não existe degradação das clorofilas. Observa-se um aumento significativo do teor de antocianinas nestas plantas, apesar de não se observar uma coloração avermelhada mais intensa visualmente, em relação às plantas controlo (**Figura 6.39-a**).

Apesar de não se observarem diferenças significativas na capacidade antioxidante, existe um aumento significativo na atividade da SOD, CAT e POD, estando estas enzimas envolvidas na defesa da planta face ao stresse induzido pelo Ni. A SOD é a primeira linha de defesa, convertendo o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  que, posteriormente, é convertido em água, pela CAT e POD. A concentração de ASA e GR diminuem significativamente, indicando que esta enzima e metabolito não são efetivos na defesa da planta (**Figura 6.42-c**).

Nas plantas contaminadas com  $300 \text{ mg Ni kg}^{-1}$  com adição de estrume, existe uma diminuição significativa nos indicadores de stresse oxidativo e danos nas membranas, indicando que provavelmente está a atuar um eficiente sistema antioxidante.





Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, o teor de clorofila a, b e total aumenta de forma significativa evidenciando que não existem danos nas clorofilas. Não se observam diferenças significativas nos teores de compostos fenólicos nem na atividade da PAL. Existe um aumento significativo no teor de antocianinas nestas plantas, apesar de não se verificar o aparecimento de uma coloração avermelhada mais intensa visualmente (**Figuras 6.39-a**).

Não existem diferenças significativas nem na atividade antioxidante nem nas atividades das enzimas estudadas, não se observando diferenças significativas relativamente ao controlo. O ASA aparentemente também não está a atuar como mecanismo antioxidante não-enzimático (**Figura 6.42-c**).

A presença de uma concentração menor de níquel, induz a ativação da SOD, CAT e POD, que aparentemente são efetivas na manutenção dos níveis baixos de  $H_2O_2$  nas células. Para além disso, também existe a produção de antocianinas que são eficazes na remoção das ROS. No entanto, esta resposta parece não ser suficiente para evitar o aparecimento de danos oxidativos nas membranas.

Na exposição a uma concentração superior de níquel, a produção de antocianinas parece ser a única forma de a planta lidar com o stresse oxidativo induzido pela presença de  $300\text{ mg Ni kg}^{-1}$ , evitando o aparecimento de peroxidação lipídica. Outros mecanismos que não foram determinados neste trabalho também poderão estar a atuar para evitar o stresse oxidativo.

Em suma, a contaminação com  $37,5\text{ mg Ni kg}^{-1}$  desencadeia na planta uma resposta mais intensa para todas as modalidades. A presença de níveis mais baixos de Ni origina o aparecimento da peroxidação lipídica (S, SC, SE) e degradação da clorofila (S, SC) devido à produção excessiva de peróxido de hidrogénio (S, SC). Na modalidade S, existe a ativação do sistema antioxidante formado por compostos fenólicos/POD/ASA. A modalidade SC é a que ativa uma maior quantidade de enzimas, CAT, POD e APX, sendo a APX a mais efetiva no combate ao stresse. Nas plantas que se desenvolveram na modalidade SE ocorre a ativação da SOD, CAT e POD, assim como a produção de antocianinas, sendo estes mecanismos suficientes para evitar os níveis de ROS em excesso.

As plantas contaminadas com uma concentração superior de Ni tiveram uma resposta diferente. Na modalidade S existe a produção de compostos fenólicos e a produção do metabolito antioxidante, ASA, que não são suficientes para evitar o stresse oxidativo e danos nas membranas. Na modalidade SC e SE não existe peroxidação lipídica nem excesso de  $H_2O_2$ . Com a adição de cortiça, a CAT provavelmente consegue manter os níveis de ROS baixos nas células, enquanto na modalidade em que se adiciona estrume, a resposta da planta



consiste na produção de antocianinas que são efetivas em manter os níveis baixos de ROS nas células.

#### 6.4.4.6. Avaliação da toxicidade induzida por Ni

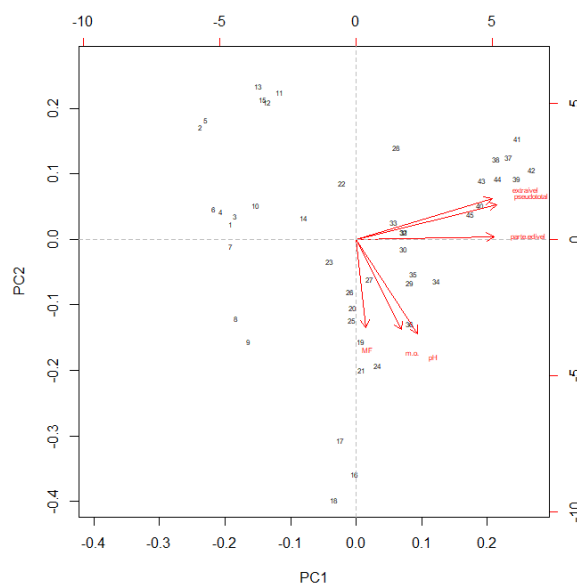
Na **Tabela 6.28** encontram-se os resultados para o Índice de Tolerância (IT) da parte edível das plantas de alface contaminadas com níquel que se desenvolveram em solo, com e sem adição de corretivos.

**Tabela 6.28** – Índice de tolerância da parte aérea, de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Ni e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

Modalidade	IT (%)				
	[Ni] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	37,5	75	150	300
S	100	86,12	95,55	96,58	101,26
SC	100	90,60	84,14	89,65	105,97
SE	100	104,24	86,71	80,27	92,46

Não existem grandes variações nos valores obtidos para o índice de tolerância das plantas contaminadas, comparativamente às plantas controlo, inclusivamente, existem valores próximos de 100 % para as plantas mais contaminadas, indicando que estas plantas apresentam níveis de tolerância relativamente elevados na presença de níquel. Também não se observam diferenças entre as diferentes modalidades (S, SC, SE).

Para se avaliar a relação entre as variáveis estudadas realizou-se uma análise em componentes principais (ACP) (**Figura 6.43**). Nesta análise considerou-se 6 variáveis: parte edível (corresponde à concentração de Ni na parte edível, mg kg<sup>-1</sup> MS), pseudototal (corresponde à concentração de Ni na fração pseudototal, mg kg<sup>-1</sup> MS), extraível (corresponde à concentração de Ni na fração extraível, mg kg<sup>-1</sup> MS), pH, m.o. (matéria orgânica, %) e MF (massa fresca, g).

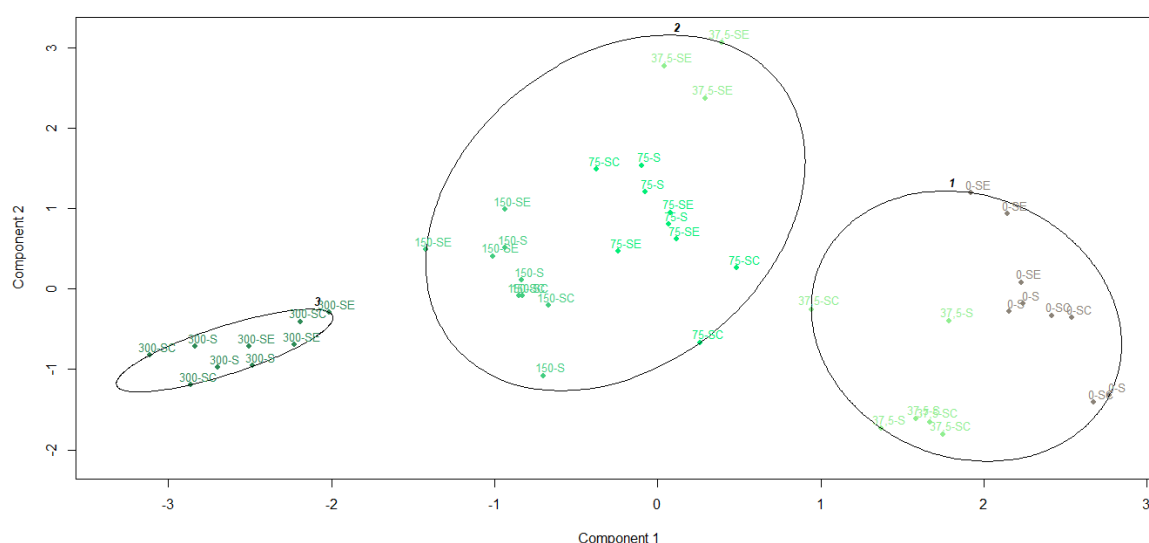


**Figura 6.43** – Análise em componentes principais realizada para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Ni (n=3), considerando 6 variáveis: *parte edível*, *pseudototal*, *extraível*, *pH*, *m.o.* e *MF*.

As variáveis estão representadas a **vermelho**: vetores paralelos, significa que as variáveis estão bem correlacionadas; vetores com o cosseno do ângulo superior a 90° indicam uma má correlação.

Na análise em componentes principais observa-se que as variáveis concentração de Ni presente na fração pseudototal e extraível estão muito bem correlacionadas, ou seja, quando a quantidade de Ni presente na fração pseudototal aumenta, o mesmo acontece na fração extraível. Tal como seria de esperar, a concentração de Ni presente na parte edível também está correlacionada com estas duas variáveis. O comportamento observado para a variável massa fresca da parte edível, pH e m.o. indicam que estas variáveis não se correlacionam bem com as restantes variáveis. No caso da massa fresca este comportamento não é oposto, tal como verificado para outros EPTs (**Figuras 6.16, 6.25, 6.34**), o que pode estar relacionado com o facto de o níquel não ter um efeito de toxicidade na massa fresca das plantas de alface, sendo isso evidenciado pelos índices de tolerância obtidos. A ACP é explicada num total de 70,55 % pela relação entre a componente principal 1 e a componente principal 2 (PC1 vs PC2).

Para se avaliar a toxicidade dos EPTs estudados realizou-se uma análise classificatória com o método de partição (PAM) que permitisse separar os indivíduos por classes (**Figura 6.44**), considerando-se as 6 variáveis referidas anteriormente.



**Figura 6.44** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Ni ( $n=3$ ). Estas duas componentes explicam 70,55 % da variabilidade.

Os indivíduos estão apresentados com base na concentração de Ni (0, 37,5, 75, 150, 300  $\text{mg kg}^{-1}$ ) e na modalidade aplicada (S- sem adição de corretivos; SC- adição de cortiça; SE- adição de estrume).

Na análise classificatória observam-se três classes bem distintas, apesar de as plantas de alface terem-se apresentado bastante tolerantes à presença de níquel: (i) uma classe constituída pelos indivíduos controlo e com a menor contaminação aplicada (37,5  $\text{mg Ni kg}^{-1}$ , S e SC); (ii) outra classe composta pelos indivíduos contaminados com 37,5 (SE), 75 e 150  $\text{mg Ni kg}^{-1}$  (S, SC, SE), observando-se nuvens de pontos com os indivíduos contaminados com as mesmas concentrações mais próximos, ou seja, mais semelhantes entre si; e (iii) uma classe bem distinta com todos os indivíduos mais contaminados (300  $\text{mg Ni kg}^{-1}$ , S, SC, SE).

### *Conclusões intercalares*

A adição de corretivos orgânicos, como a cortiça e estrume, provoca uma diminuição do teor de Ni na fração extraível. O pH do solo não sofre alterações, tendo-se obtidos valores perto da neutralidade. Por outro lado, como seria de esperar os teores de matéria orgânica aumentam nas modalidades onde se adicionaram corretivos.

A acumulação de Ni pela alface apresenta um comportamento hiperbólico, sendo a acumulação de níquel crescente e tendendo para um patamar de saturação. No entanto, a presença de corretivos não tem influência na acumulação de uma maior ou menor quantidade de Ni na parte edível da alface.



Nos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade é possível verificar que não se observam diferenças significativas entre as plantas controlo e as plantas contaminadas, em nenhuma modalidade (S, SC, SE). A planta de alface, aparentemente, demonstra ser bastante tolerante à presença deste elemento, tal como evidenciam os valores de IT obtidos, porque possui mecanismos de destoxificação eficientes na parte aérea.

O teor de Ni presente na parte edível das plantas contaminadas encontra-se, acima dos valores normais presentes em hortícolas não contaminados referidos por Nagajyoti et al. (2010) (inferiores a  $1,0 \text{ mg Ni kg}^{-1} \text{ MS}$ ) e por Varennes (2003) (entre  $1\text{-}10 \text{ mg Ni kg}^{-1} \text{ MS}$ ). Apesar de os resultados obtidos estarem acima dos valores normais para hortícolas, a ingestão diária de níquel estimada é inferior à dose de referência pelo que não constituem uma preocupação na contaminação da cadeia alimentar.

Pode-se concluir que nestas condições de ensaio, a adição dos corretivos testados neste trabalho (estrume de cavalo seco e pó de cortiça), apesar de diminuírem o teor de Ni na fração extraível não contribuíram para a diminuição da acumulação de níquel pela planta de alface.

#### 6.4.5. Zinco

##### 6.4.5.1. Caracterização do solo artificialmente contaminado com Zn

Na **Figura 6.45-a** apresentam-se as medições dos valores pseudototais de Zn no solo que são bastante próximos dos valores nominais (a quantidade teoricamente adicionada). As frações extraíveis, considerando a maior contaminação de zinco, correspondem a 2,27, 2,37 e 2,14 %, do total presente no solo S, SC e SE, respetivamente (**Figura 6.45-b**).

Segundo o Decreto-lei (n.º 276/2009), o valor de referência de Zn, em solos neutros, aos quais se pretende adicionar lamas de depuração, é de  $300 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ . Se considerarmos solos em que se pretende aplicar matéria fertilizante, o valor é de  $150 \text{ mg Zn kg}^{-1}$  (Decreto-Lei, n.º 103/2015). A legislação canadiana define o valor de  $340 \text{ mg Zn kg}^{-1}$  para uso agrícola. A legislação holandesa refere o valor referência é de  $140 \text{ mg kg}^{-1}$  e o valor de intervenção é de  $720 \text{ mg Zn kg}^{-1}$  (Leitão et al., 2016b).

Na fração extraível só existem diferenças significativas, em relação ao controlo, para as concentrações mais elevadas de Zn ( $600$  e  $1200 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ ). Nas concentrações mais baixas de Zn, a quantidade extraível é muito diminuta e parecida aos valores obtidos nos solos controlo. Existe um aumento bastante significativo da quantidade de Zn extraível em solos contaminados com  $1200 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ , para todas as modalidades. No entanto, os resultados



mostram que a presença destes dois corretivos orgânicos não tem influência na disponibilidade de Zn no solo, uma vez que não existem diferenças significativas na fração extraível entre S, SC e SE, para todos os solos contaminados com Zn.

Os resultados obtidos para o pH, matéria orgânica, fósforo extraível e potássio extraível encontram-se representados na **Figura 6.46**.

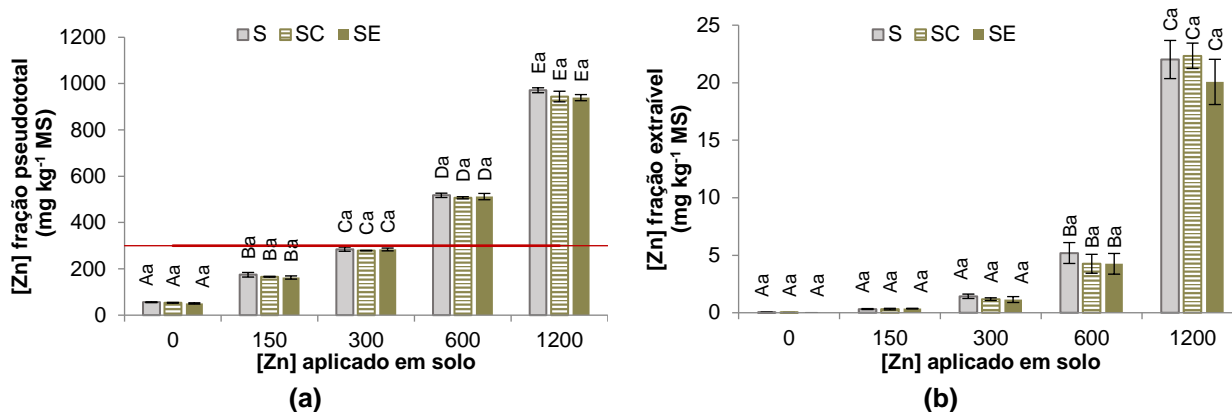
Os resultados obtidos para o fósforo extraível (**Figura 6.46-c**) e potássio extraível (**Figura 6.46-d**) encontram-se muito elevados ( $> 200$ ) e elevados (100-200), respetivamente. O pH apresenta uma tendência para diminuir com o aumento da concentração de Zn no solo (**Figura 6.46-a**). No solo S ( $6,82 \pm 0,03$ ;  $6,53 \pm 0,04$ ) e SE ( $6,86 \pm 0,02$ ;  $6,47 \pm 0,03$ ) há uma diminuição significativa, com 600 e 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup>, em relação ao controlo (S:  $7,21 \pm 0,16$ ; SC:  $6,98 \pm 0,25$ ; SE:  $7,27 \pm 0,12$ ), respetivamente. O solo SC apenas apresenta essa diminuição para a concentração mais elevada de Zn aplicada ( $6,46 \pm 0,02$ ). Este efeito na diminuição do pH é acompanhado por uma maior quantidade de Zn presente no solo e disponível para a planta poder acumular, existindo uma relação entre o meio ácido e o favorecimento do aumento da presença de Zn no solo.

Os corretivos orgânicos possuem quantidades de matéria orgânica superiores, o que pode minimizar a biodisponibilidade de Zn através da sua adsorção ou formação de complexos estáveis. Assim, como seria de esperar, relativamente aos valores obtidos para a matéria orgânica existe um aumento significativo nas modalidades SC e SE, relativamente ao solo S (**Figura 6.46-b**). Por outro lado, não se verificam grandes variações entre as amostras controlo e contaminadas.

#### 6.4.5.2. Caracterização da acumulação de Zn em alface

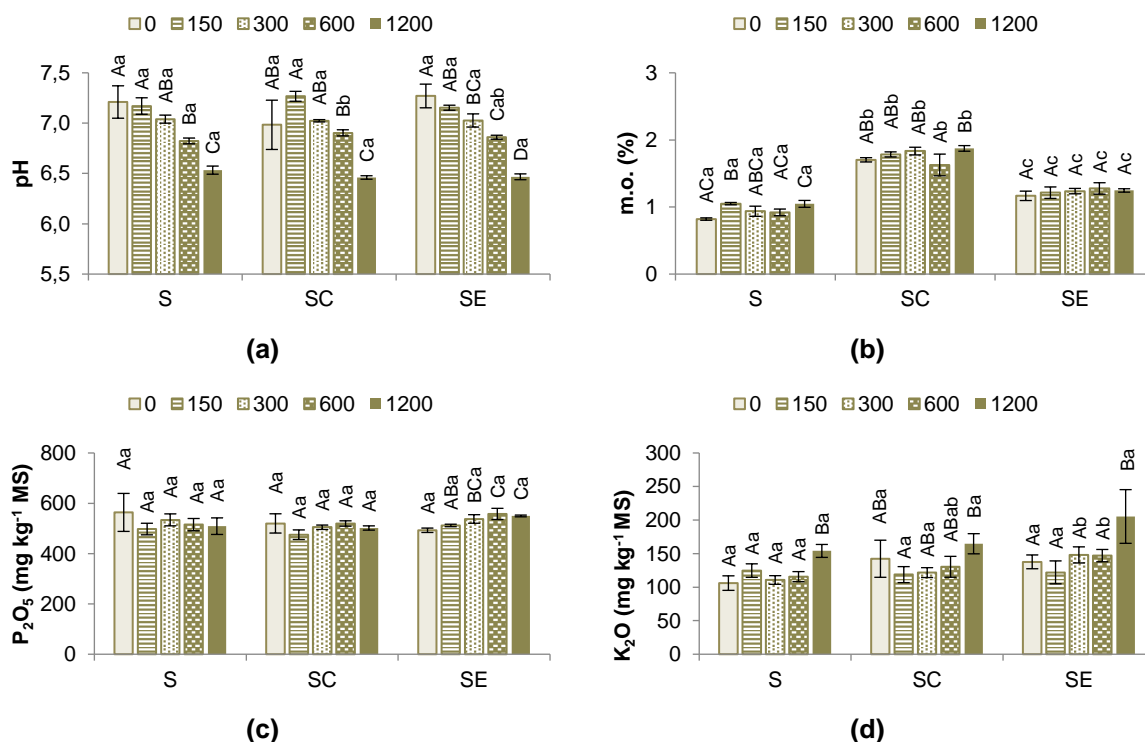
O comportamento da acumulação de Zn, na parte edível da alface M4E, em função da concentração de Zn aplicado em solo, para as diferentes modalidades em estudo, encontra-se apresentado na **Figura 6.47**.

A acumulação de Zn, na parte aérea da alface M4E, apresenta um comportamento linear e, nestas condições de ensaio, verifica-se que existe um ajuste razoável ao modelo linear, tal como indicam os valores de  $R^2 > 0,98$ .



**Figura 6.45** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Zn e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) concentração pseudototal de Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) e (b) concentração de Zn na fração extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS).

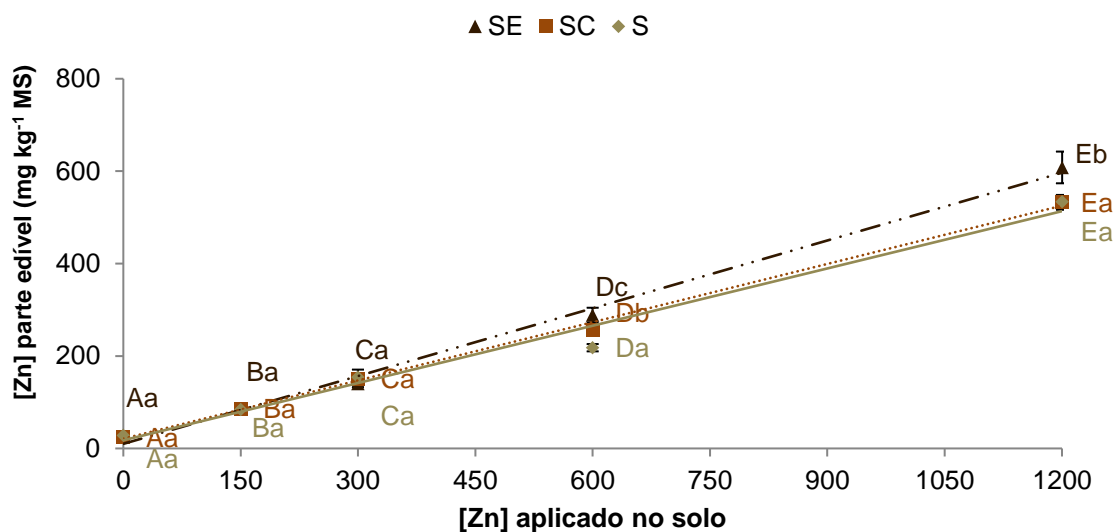
As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Zn aplicado ( $n=3$ ). A linha **a vermelho** representa o valor máximo de Zn que pode estar presente nos solos ( $300 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ ).



**Figura 6.46** – Análises efetuadas ao solo contaminado com diferentes concentrações de Zn e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE): (a) pH, (b) matéria orgânica (%), (c) fósforo extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) e (d) potássio extraível ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Zn aplicado ( $n=3$ ).





dias	<i>m</i>	<i>b</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	Linha
S	0,41	17,62	0,9812	—
SC	0,42	21,05	0,9977	.....
SE	0,49	9,93	0,9955	- - -

**Figura 6.47** - Concentração de Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controlo), 150, 300, 600 e 1200  $\text{mg Zn kg}^{-1}$ , com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Zn aplicado ( $n=3$ ).

É possível verificar que à medida que a concentração de zinco no solo aumenta, a planta acumula uma maior quantidade de Zn na parte edível, uma vez que existem diferenças significativas entre as plantas controlo e as plantas contaminadas com as diferentes concentrações de Zn. Esta acumulação é crescente e está longe de atingir um patamar de saturação, uma vez que existem diferenças significativas entre plantas expostas a 600 e 1200  $\text{mg Zn kg}^{-1}$  para todas as modalidades (S, SC, SE). A planta de alface M4E parece continuar a suportar a acumulação deste metal na parte edível ou até a aplicação de concentrações mais elevadas para atingir uma presumível saturação.

Verifica-se que a planta de alface apresenta uma elevada capacidade de acumulação de Zn na sua parte edível. Roy e McDonald (2015) referiram que a acumulação de Zn foi preferencial nas folhas de alface, relativamente a outros tecidos da planta, acumulando uma maior quantidade deste elemento na parte aérea relativamente às raízes.



Com a adição dos corretivos orgânicos, é possível verificar que não ocorre uma diminuição da acumulação de Zn na parte edível da planta de alface. Pelo contrário, a contaminação com 600 (SC e SE) e 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup> (SE), origina um aumento significativo do teor de Zn na parte aérea de plantas. Ao contrário do que seria de esperar, as plantas que se desenvolveram em solos sem adição de corretivos, acumularam uma quantidade ligeiramente inferior de Zn, principalmente, em relação à modalidade com adição de estrume.

No entanto, o efeito da diminuição de Zn absorvido nas plantas com a adição de corretivos ricos em matéria orgânica tem sido verificado por outros autores (Houben et al., 2013; Irshad et al., 2014; Shaheen et al., 2017; Wolf et al., 2017).

Os teores de Zn presentes na parte aérea de plantas expostas a 150 mg Zn kg<sup>-1</sup> (84,02±5,16 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (S), 86,27±5,98 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (SC) e 85,52±1,83 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (SE)), assim como de plantas contaminadas com 300 mg Zn kg<sup>-1</sup> (154,96±16,64 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (S), 150,86±9,55 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (SC) e 139,88±7,23 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (SE)) encontram-se no intervalo dos valores normais de zinco presentes nos tecidos vegetais (15-200 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (Nagajyoti et al., 2010)). É importante realçar que a exposição de plantas de alface a uma concentração inferior (150 mg Zn kg<sup>-1</sup>) ao valor limite de referência da concentração de zinco nos solos neutros (300 mg Zn kg<sup>-1</sup>), não resulta numa acumulação superior ao valor recomendado deste elemento em hortícolas de folha.

Por outro lado, os valores obtidos nas plantas mais contaminadas com 600 mg Zn kg<sup>-1</sup> (218,02±7,93 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (S), 256,38±11,51 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (SC) e 288,38±16,09 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (SE)) e 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup> (533,52±7,43 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (S), 535,54±16,06 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (SC) e 608,10±34,31 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (SE)), estão acima dos valores normais de zinco presentes nos tecidos vegetais (15-200 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS, (Nagajyoti et al., 2010)).

Na **Tabela 6.29** estão os resultados obtidos para o fator de transferência do solo que permitem verificar a capacidade que as plantas de alface têm em transferir o Zn presente no solo para a sua parte edível, sendo um fator para controlar a exposição humana aos EPTs através da cadeia alimentar.

O fator de transferência não sofre grandes variações, comparativamente às plantas controlo, com o aumento da concentração de Zn no meio, logo a capacidade da planta em transferir o zinco para a sua parte edível não depende da quantidade deste elemento presente no solo, indicando que a acumulação deste elemento, permanece constante para o intervalo de concentração de zinco aplicado.



**Tabela 6.29** – Fator de transferência do solo para a alface M4E que se desenvolveu em solo, sujeita a diferentes concentrações de Zn e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

Modalidade	Fator de transferência (FT)				
	[Zn] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	150	300	600	1200
S	0,51	0,48	0,54	0,42	0,55
SC	0,46	0,52	0,54	0,51	0,56
SE	0,55	0,53	0,49	0,56	0,65

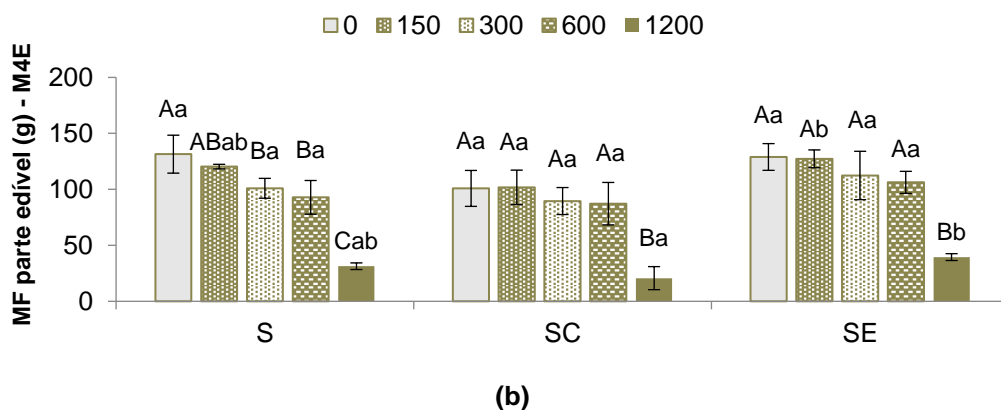
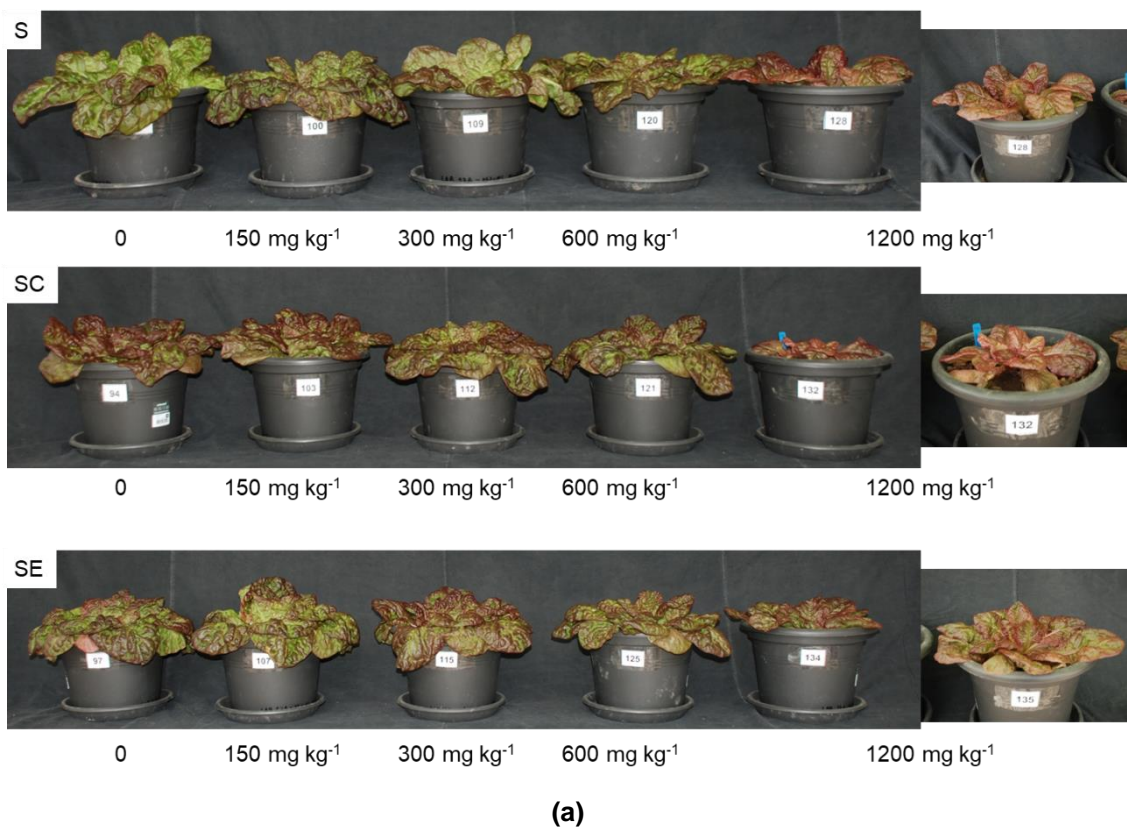
O FT permanece, aproximadamente, constante para todas as modalidades (S, SC, SE), ou seja, a presença de pó de cortiça ou estrume de cavalo, aparentemente, não afeta a capacidade da planta em transferir o Zn presente no solo para a sua parte edível. Estes resultados estão concordantes com os obtidos para a acumulação de zinco para cada modalidade (**Figura 6.47**).

Os valores obtidos de FT para o Zn são semelhantes, apesar de ligeiramente superiores, aos obtidos para o Ni (**Tabela 6.25**), provavelmente por serem dois elementos essenciais para a planta.

Khan et al. (2010) também obtiveram valores de FT para o Zn, parecidos aos obtidos neste estudo, em alface (0,25), espinafre (0,21), mostarda (0,57), menta (0,15), couve-flor (0,20) e chicória (0,90). Outros autores também obtiveram diversos valores de FT para alface: 0,127 para uma concentração de 3690,0 mg Zn kg<sup>-1</sup> solo (Luo et al., 2011), 0,29–0,58 para uma concentração de 97,3±28,1 mg Zn kg<sup>-1</sup> solo (Wang et al., 2012), 0,4–0,6 para uma concentração de 191,0±101,0 mg Zn kg<sup>-1</sup> solo (Xu et al., 2013), 0,074 para uma concentração de 120,0±38,3 mg Zn kg<sup>-1</sup> solo (Adamo et al., 2014), e 0,320 para uma concentração de 1112,0±10,0–379,0±13,0 mg Zn kg<sup>-1</sup> solo (Malandrino et al., 2011).

#### 6.4.5.3. Avaliação dos parâmetros vegetativos e sintomas visíveis de toxicidade

Os resultados obtidos para a massa fresca da parte aérea e os sintomas visíveis de toxicidade observados na alface M4E, para cada modalidade e com diferentes concentrações de Zn, aplicados em solo, encontram-se na **Figura 6.48**.



**Figura 6.48** – Massa fresca da parte edível (a) e o registo fotográfico (b) de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo contaminado com Zn e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controlo e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Zn aplicado ( $n=3$ ).



Em todas as modalidades, é notória uma diminuição do tamanho da parte aérea com o aumento da concentração de Zn presente no solo, sendo isso mais evidente para a contaminação com 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup>. Na modalidade S também se verifica que as plantas mais contaminadas apresentam uma coloração avermelhada nas folhas. As plantas onde se adiciona cortiça e estrume no solo apresentam um desenvolvimento ligeiramente inferior em relação às plantas que cresceram sem adição de corretivos. As plantas da modalidade com adição de cortiça parecem mais avermelhadas que as plantas das outras modalidades (**Figura 6.48-a**).

Através da observação dos resultados, é possível verificar que existe uma tendência para a diminuição da massa fresca da parte aérea das plantas de alface, com o aumento da concentração de zinco no solo. Na modalidade sem adição de corretivos existe uma diminuição significativa para plantas contaminadas com concentrações de Zn superiores a 300 mg Zn kg<sup>-1</sup>, sendo esta diminuição muito evidente para a concentração mais elevada de Zn aplicada. Nas modalidades SC e SE, apenas se verifica uma diminuição bastante significativa para plantas contaminadas com 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup> (**Figura 6.48-b**). Os valores percentuais de diminuição da biomassa das plantas contaminadas com a maior concentração de zinco, comparativamente às plantas controlo, correspondem a 76,2, 79,5 e 69,4 %, para as modalidades S, SC e SE, respetivamente.

#### 6.4.5.4. Avaliação do risco associado à ingestão de Zn

Na **Tabela 6.30** encontram-se os resultados obtidos para a ingestão diária estimada de zinco através do consumo de alface e na **Tabela 6.31** estão os valores dos parâmetros de avaliação associados à exposição a zinco para a saúde dos seres humanos.

**Tabela 6.30** – Ingestão diária estimada, da parte edível de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Zn e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

Modalidade	IDE (mg dia <sup>-1</sup> )*				
	[Zn] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	150	300	600	1200
S	0,138	0,411	0,753	1,066	2,610
SC	0,121	0,422	0,738	1,254	2,605
SE	0,137	0,418	0,684	1,411	2,974

\*considerando o valor médio de ingestão média diária de alface de 22,5 g dia<sup>-1</sup> para adultos (WHO, 2003).

**Tabela 6.31** – Parâmetros de avaliação associados à exposição ao Zn para a saúde do ser humano.

Parâmetros de avaliação	Valores referência obtidos para o Zn	Referências Bibliográficas
<i>LOAEL</i>	59,3 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	(Hough et al., 2004b)
<i>RfD</i>	10 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	(Hough et al., 2004b)
<i>ARs</i>		
<i>homem</i>	7,5-12,7 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	(EFSA, 2014a)
<i>mulher</i>	6,2-10,2 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	
<i>homem</i>	11 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	(NIH, 2016)
<i>mulher</i>	8 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	
<i>TDI</i>	0,3 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> 0,566 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	(EPA, 2007) (Canada, 2007)
<i>UL</i>	40 mg dia <sup>-1</sup>	(NIH, 2016)

- *LOAEL* (do inglês, *Lowest Observed Adverse Effect Level*) – concentração ou quantidade mínima de substância, que não causa efeito adverso num organismo vivo.

- *RfD* - dose de referência ou dose oral máxima aceitável de uma substância, que provavelmente não terá risco significativo de efeitos nocivos durante a vida.

- *ARs* (do inglês, *Average Requirements*) - nível médio diário de ingestão que é suficiente para fornecer os nutrientes em indivíduos saudáveis.

- *TDI* – (do inglês, *Tolerable Daily Intake*) - ingestão diária tolerável de uma substância potencialmente nociva ou contaminante de alimentos que pode ser ingerida ao longo da vida sem risco de efeitos adversos para a saúde.

- *UL* (*Tolerable Upper Intake Level*) - nível máximo de ingestão tolerável ou ingestão diária máxima que não provoca efeitos adversos na saúde.

A ingestão média diária de alface é de 22,5 g dia<sup>-1</sup> para adultos (WHO, 2003) e considera-se um teor médio de humidade nas plantas de alface de 95,4 %. Através dos dados obtidos no presente estudo é possível verificar que a ingestão diária de Zn estimada varia entre 2,605 e 2,974 mg dia<sup>-1</sup>, considerando a maior concentração de Zn presente no solo. No caso, de plantas de alface que se desenvolveram em solos contaminados com 150 mg Zn kg<sup>-1</sup>, é possível verificar que os valores são mais baixos e variam entre 0,411 e 0,422 mg dia<sup>-1</sup>.

De acordo com os dados obtidos, considerando uma pessoa de 70 kg, a ingestão diária de Zn estimada varia entre 37,21-42,49 µg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (considerando o caso mais grave de contaminação) e entre 5,87-6,03 µg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (considerando o caso menos grave de contaminação).

O zinco é um elemento essencial necessário como parte de uma dieta saudável. Neste sentido, comparando os valores de IDE obtidos para a alface e a dose de referência 10 mg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> referida na **Tabela 6.19**, assim como o *LOAEL* (59,3 mg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>) é possível verificar que os valores obtidos são inferiores a estes parâmetros. O mesmo comportamento





pode ser observado por comparação com os valores de *ARs* (EFSA, 2014a; NIH, 2016) e *TDI* (Canada, 2007; EPA, 2007)

Outros autores também verificaram que não existe um risco associado à ingestão de hortícolas de folha como a alface, tal como Khan et al. (2010) em que verificaram que o valor de ingestão diária obtido por através do consumo de alface contaminada com Zn ( $173\text{--}1194\text{ mg kg}^{-1}$ ) foi de  $0,022\text{ mg kg}^{-1}\text{ dia}^{-1}$  (adulto) e  $0,032\text{ mg kg}^{-1}\text{ dia}^{-1}$  (criança). Os autores verificaram que a ingestão diária de Zn foi inferior à *RfD*. Por outro lado, existem estudos que referiram que os teores de Zn presente em alface e cenoura apresentaram um potencial para causar problemas toxicológicos em homens, mulheres e crianças devido à acumulação de Zn (Roy e McDonald, 2015).

A absorção de Zn ocorre no intestino delgado e parece ser um processo mediado por um transportador que não está saturado em condições fisiológicas normais. Uma vez no plasma, o Zn é transportado por uma série de proteínas que incluem a albumina, transferrina, etc. A maior parte do Zn absorvido é excretado pela biliar e, eventualmente, nas fezes. Parece não haver um local específico de armazenagem de zinco no organismo humano (EFSA, 2006).

#### 6.4.5.5. Caracterização da resposta da planta

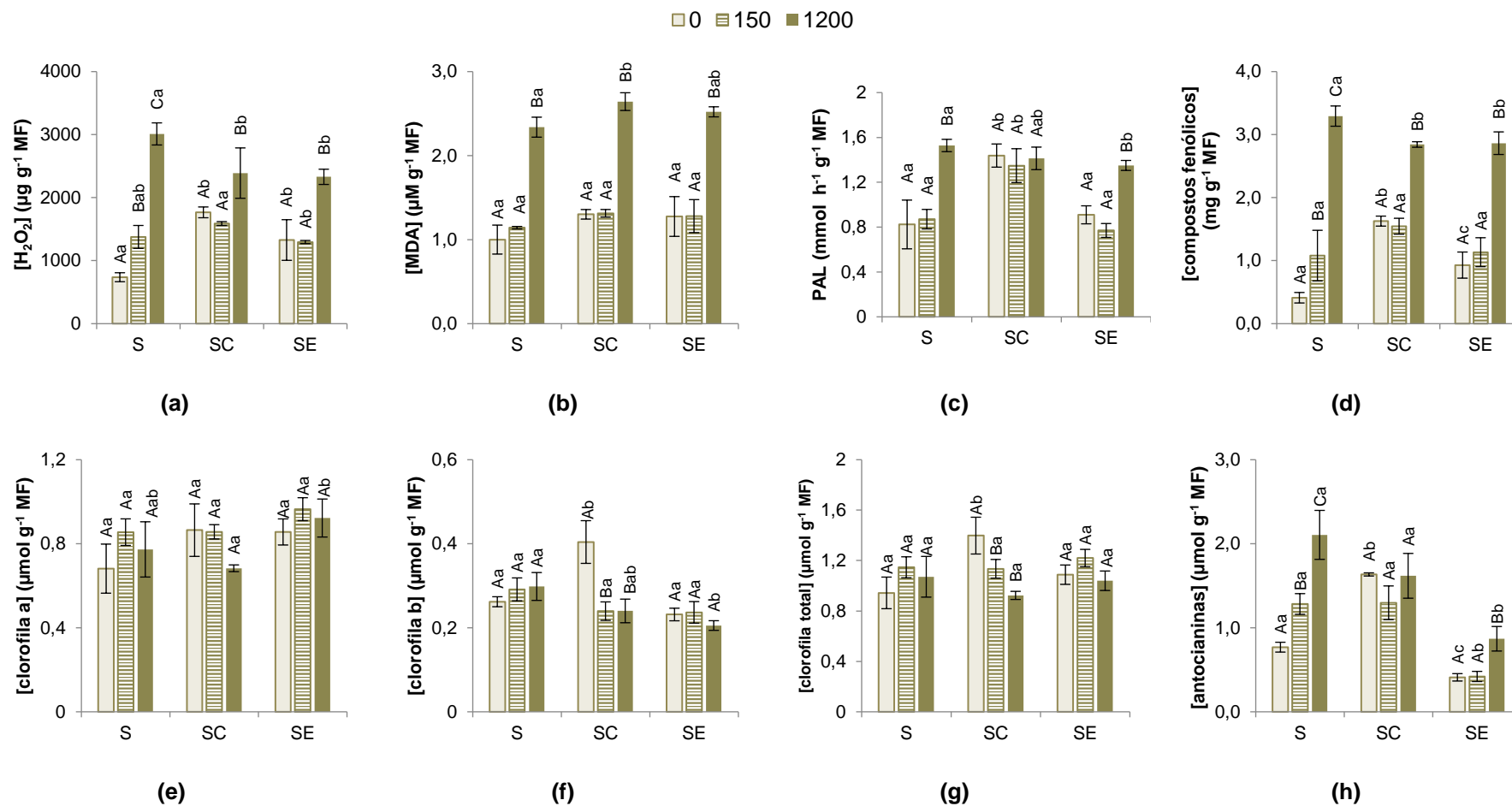
Nas **Figuras 6.49 e 6.50** encontram-se os resultados que permitem fazer a caracterização da resposta da planta de alface. Na **Figura 6.51** encontra-se uma representação esquemática da resposta antioxidante da planta face às condições de ensaio desenvolvidas neste trabalho.

#### Solos sem adição de corretivos (S)

Nas plantas contaminadas com  $150\text{ mg Zn kg}^{-1}$  sem adição de corretivos, apesar de não existirem diferenças significativas, em relação ao controlo, na concentração de MDA, há um aumento significativo no teor de peróxido, indicando a possível existência de stresse oxidativo.

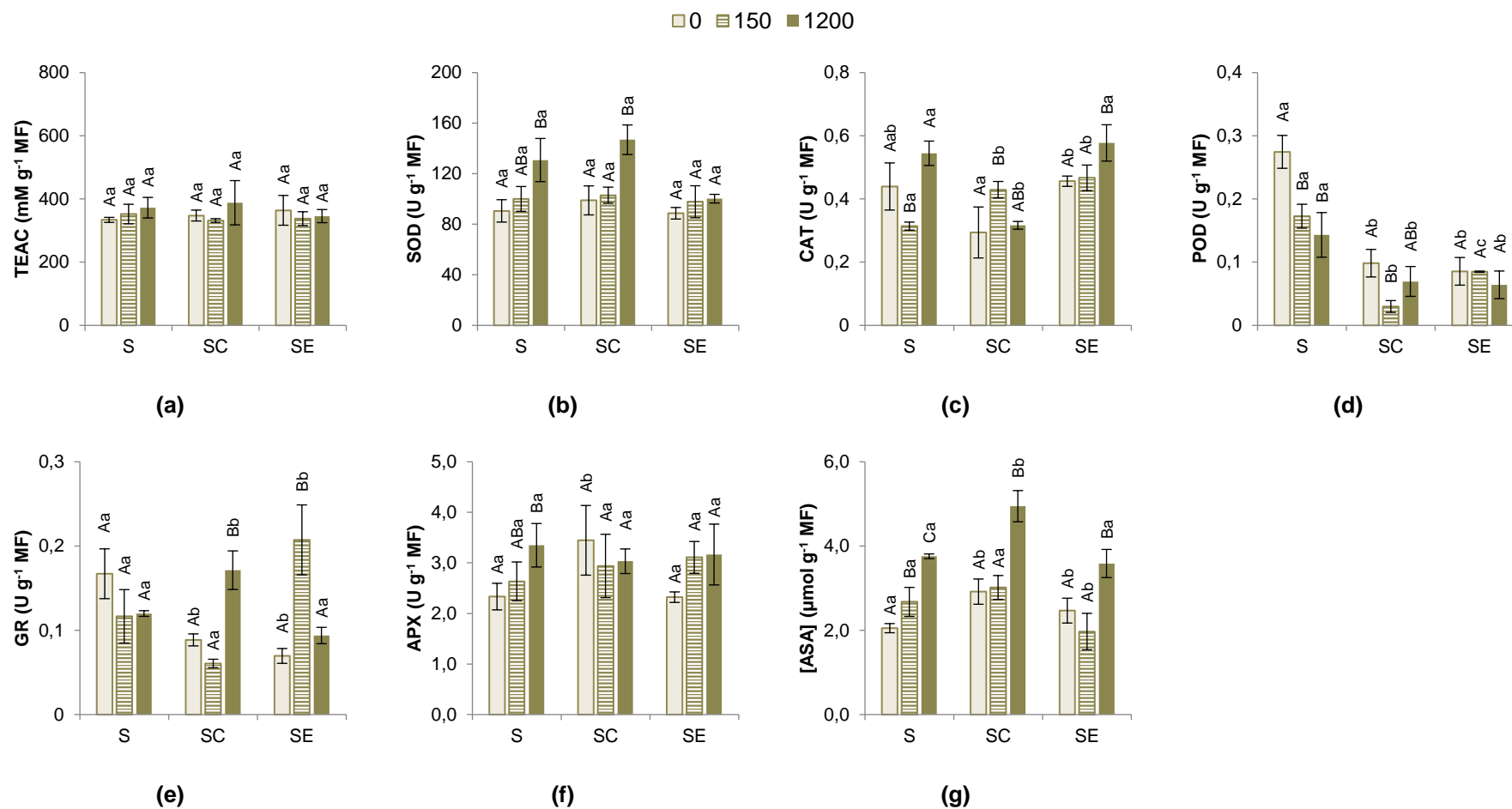
Apesar de existir uma tendência crescente, não se observam diferenças significativas na atividade antioxidante. Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse não se observam diferenças significativas na concentração de clorofila a, b e total, indicando que não existem danos nos pigmentos fotossintéticos. Apesar de não se observarem diferenças significativas na atividade da PAL, existe um aumento significativo na produção de compostos fenólicos e antocianinas, tal como se observa visualmente (**Figura 6.48-a**). Estes compostos resultam da ativação de reações secundárias que os faz atuar como sequestradores de metais e/ou remover as ROS.





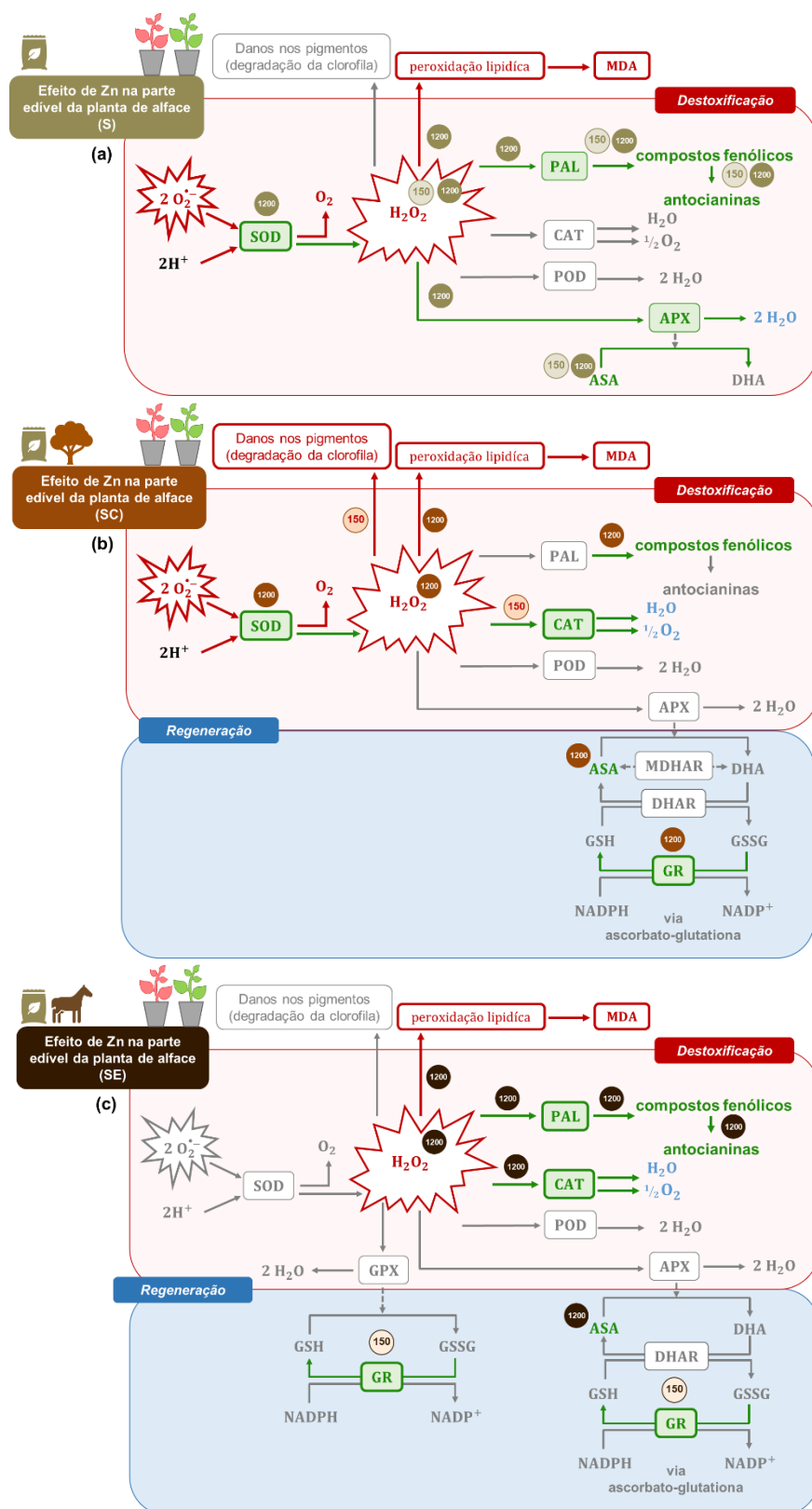
**Figura 6.49** – Parâmetros indicadores de stresse oxidativo (a) e danos nas membranas (b) e parâmetros de avaliação da intensidade do stresse (c, d, e, f, g, h) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 150 e 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup>, com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controle e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Zn aplicado ( $n=3$ ).



**Figura 6.50** – Atividade antioxidante total (a), enzimas antioxidantes (b,c,d,e,f) e metabolitos antioxidantes (g) na parte edível de plantas de alface M4E ao fim de 50 dias de crescimento em solo com 0 (controle), 150 e 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup>, com diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão; as letras maiúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras controle e amostras contaminadas ( $n=3$ ); as letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras sem adição de corretivos, com adição de cortiça e com adição de estrume para cada uma das concentrações de Zn aplicado ( $n=3$ ).



**Figura 6.51** – Representação esquemática da resposta antioxidante de alfaca M4E contaminada com 150 e 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup> e sujeita a diferentes modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

A **verde** estão representados os compostos ou mecanismos ativos na defesa; a **vermelho** os compostos ou reações que são adversos; a **cinza** os mecanismos de defesa ou reações inativas; a **azul** os compostos formados que não são prejudiciais.



Não se observam diferenças significativas, em relação ao controlo, nas atividades enzimáticas da SOD, APX e GR, embora tenha sido detetada uma diminuição significativa da atividade da CAT e POD. Por outro lado, o teor de ASA aumenta significativamente, evidenciando que este metabolito antioxidante está ativo na defesa da planta e é também o responsável pela não existência de peroxidação lipídica, apesar dos níveis significativos de  $H_2O_2$  (**Figura 6.51-a**).

Nas plantas contaminadas com 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup> sem adição de corretivos, os teores de  $H_2O_2$  aumentam significativamente, relativamente à amostra controlo, indicando a existência de stresse oxidativo devido ao aumento da produção das ROS que desencadeia um aumento significativo da peroxidação dos lípidos, evidenciando o aparecimento de danos oxidativos nas células.

A atividade antioxidante não apresenta diferenças relativamente ao controlo. Não se observam danos nos pigmentos fotossintéticos, uma vez que não existem diferenças significativas nos teores de clorofila a, b e total, relativamente ao controlo.

A atividade da PAL aumenta significativamente e, por consequência, também existe uma produção significativa de compostos fenólicos e de antocianinas que são importantes na eliminação das ROS em excesso.

Existe um aumento significativo na atividade da SOD e APX, assim como no teor de ASA, indicando que estes mecanismos enzimáticos e não-enzimático são determinantes na resposta da planta face a estas condições experimentais. A SOD está ativa na conversão do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  o que conduz a uma rápida acumulação destas espécies, uma vez que a velocidade de produção é mais rápida que a de remoção nas plantas de alface, e daí os níveis elevados de peróxido nas células. O aumento da atividade da APX deve-se ao facto de esta enzima apresentar uma elevada afinidade para o substrato  $H_2O_2$ , relativamente à CAT e POD. Esta enzima é crucial na conversão do  $H_2O_2$  em  $H_2O$ , usando o ascorbato como dador específico de eletrões. Por este motivo, o teor de ASA apresenta um aumento significativo, estando possivelmente continuamente a ser produzido uma vez que é substrato desta enzima (**Figura 6.51-a**).

Nas plantas contaminadas com 150 mg Zn kg<sup>-1</sup> sem adição de corretivos, os mecanismos que são ativados (compostos fenólicos, antocianinas e ASA), não conseguem controlar os níveis de peróxido em excesso, no entanto, não se observam danos nos lípidos.

O stress oxidativo induzido pelos teores mais elevados de Zn (1200 mg Zn kg<sup>-1</sup> sem adição de corretivos) leva à ativação do metabolismo secundário (PAL/compostos



fenólicos/antocianinas) e ao aumento da atividade enzimática (SOD, APX) assim como a produção de metabolitos antioxidantes (ASA). A SOD está ativa na conversão do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ , que é convertido em água pela APX, utilizando o ascorbato como dador de eletrões. Nestas condições de ensaio, esta resposta não é suficiente para evitar o aparecimento de peroxidação lipídica.

### **Solos com adição de cortiça (SC)**

Nas plantas contaminadas com 150 mg Zn kg<sup>-1</sup> com adição de cortiça, não se observam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo e de danos oxidativos.

A atividade antioxidante não apresenta diferenças significativas relativamente ao controlo. Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse também não se observam diferenças significativas na concentração de clorofila a, no entanto existe uma diminuição significativa nos teores de clorofila b e total. Não se observam diferenças significativas na atividade da PAL nem na concentração de antocianinas e de composto fenólicos, relativamente às plantas controlo.

Também não se observaram diferenças significativas na atividade enzimática da SOD, GR e APX, tendo-se detetado uma diminuição da atividade da APX e da concentração de ASA. No entanto, existe um aumento significativo na atividade da CAT, indicando que esta enzima está ativa pela manutenção dos níveis de  $H_2O_2$ , e daí os seus níveis não estarem elevados nas células (**Figura 6.51-b**).

Nas plantas contaminadas com 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup> com adição de cortiça, observa-se um aumento significativo nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo ( $H_2O_2$ ) e nos teores de MDA, indicando a existência de peroxidação lipídica.

A atividade antioxidante não apresenta diferenças significativas relativamente ao controlo. Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, observa-se um aumento muito significativo no teor de compostos fenólicos, relativamente às plantas controlo. Estes compostos são ativados em reações secundárias resultante do stress oxidativo estando ativos na eliminação das ROS. Visualmente observa-se uma coloração avermelhada nas plantas (**Figura 6.48-a**), mas que ao nível da concentração de antocianinas não difere significativamente entre plantas contaminadas e controlo.



Há um aumento significativo na atividade da SOD, GR e no teor de ASA, evidenciando que estas enzimas/compostos antioxidantes são importantes na resposta da planta face ao stresse induzido pelo zinco. A SOD converte o  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  que conduz a uma rápida acumulação destas espécies, uma vez que mais nenhuma enzima antioxidante que tenha o peróxido de hidrogénio como substrato, está ativa. A atividade da GR também tem um aumento muito significativo podendo estar ativa na obtenção da GSH, na reação catalisada pela DHAR, originando o ASA. Este metabolito também apresenta um aumento muito significativo, em relação ao controlo, evidenciando que este poderá estar a exercer a sua atividade antioxidante, eliminando o peróxido em excesso (**Figura 6.51-b**).

Nas plantas contaminadas com a menor concentração de zinco ( $150 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ , com adição de cortiça), a CAT é a única forma de defesa da planta que controla os níveis de stresse nestas condições de ensaio, convertendo o  $H_2O_2$  em água e evitando o aparecimento de peroxidação lipídica.

Nas plantas contaminadas com  $1200 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ , com adição de cortiça, a forma de defesa da planta consiste na produção de compostos fenólicos, como resultado do stress oxidativo. Os mecanismos de destoxificação consistem na ativação da SOD que está a originar  $H_2O_2$  através da dismutação do  $O_2^{\bullet-}$ . O metabolito antioxidante ASA parece ser o único elemento crucial na eliminação do  $H_2O_2$ . No entanto, esta resposta da planta não é suficiente para equilibrar os níveis de  $H_2O_2$  e evitar o aparecimento de danos oxidativos.

### **Solos com adição de estrume de cavalo (SE)**

Não se observam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo e danos oxidativos em plantas que cresceram em solo contaminado com  $150 \text{ mg Zn kg}^{-1}$  com a adição de estrume de cavalo. Na atividade antioxidante, assim como nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, os resultados não evidenciam diferenças significativas comparativamente às plantas controlo.

Tal como a maior parte dos mecanismos antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, POD e APX) e não enzimáticos (ASA), não se verificam diferenças significativas, comparativamente às plantas controlo. A única enzima que apresenta um aumento muito significativo é a GR. Esta enzima, provavelmente, poderá estar a originar GSH, que poderá ser responsável por manter os níveis de  $H_2O_2$  baixos nas células ou a originar este substrato para a enzima GPX, e daí não existirem teores significativos de peróxido de hidrogénio (**Figura 6.51-c**).



Nas plantas contaminadas com 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup> com adição de estrume, verifica-se um aumento muito significativo nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e danos oxidativos (MDA).

A atividade antioxidante não demonstra evidências em aumentar, comparativamente às plantas controlo. Nos parâmetros de avaliação da intensidade do stresse, os resultados obtidos evidenciam que não existem danos nos pigmentos fotossintéticos, uma vez que não existem diferenças significativas nos teores de clorofila a, b e total. Por outro lado, existe um aumento na atividade enzimática da PAL, que está relacionado com o aumento significativo da produção de antocianinas e de compostos fenólicos, comparativamente às plantas controlo.

Na maior parte dos mecanismos antioxidantes enzimáticos (SOD, POD, APX e GR) não se observam diferenças significativas, comparativamente ao controlo, o que significa que estas enzimas não estão envolvidas na resposta da planta face ao stresse induzido pelo zinco. Há um aumento muito significativo da atividade da CAT, demonstrando que é a única enzima que poderá estar ativa na remoção dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentes nas células. A concentração de ASA também aumenta significativamente, evidenciando que este metabolito antioxidante pode estar ativo nos mecanismos de defesa da planta. No entanto, estes mecanismos não são suficientes para evitar o aparecimento de danos oxidativos nas plantas (**Figura 6.51-c**).

Nas plantas contaminadas com 150 mg Zn kg<sup>-1</sup> com adição de estrume, não se observam diferenças significativas nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo, danos nas membranas e avaliação da intensidade do stresse. Relativamente à defesa antioxidante, a GR é a única enzima que apresenta um aumento muito significativo na sua atividade. Esta enzima pode originar o metabolito antioxidante (GSH), que pode funcionar só por si como um antioxidante ou pode ser o substrato da enzima GPX.

Nestas condições de ensaio (1200 mg Zn kg<sup>-1</sup>, com adição de estrume), a forma da planta responder aos níveis elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, consiste na ativação do metabolismo secundário (PAL/compostos fenólicos/antocianinas), assim como da defesa antioxidante (CAT e ASA). Esta resposta não é eficiente, uma vez que não evita o aparecimento de danos nas membranas.

Em suma, nas plantas contaminadas com 150 mg Zn kg<sup>-1</sup>, apenas na modalidade S não se consegue controlar os níveis de peróxido de hidrogénio nas células, evidenciando que as plantas desta modalidade são menos tolerantes à presença de Zn. As plantas da modalidade S ativam o metabolismo secundário (compostos fenólicos/antocianinas) e a produção de ASA.





Nas modalidades SC e SE, as plantas contaminadas não apresentam um aumento significativo nos parâmetros indicadores de stresse oxidativo nem de danos nas membranas, havendo a ativação de mecanismos pontuais que são efetivos em manter os níveis de peróxido baixos.

A contaminação com 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup> provoca uma resposta intensa na planta, evidenciando a menor tolerância da alface à acumulação de quantidades excessivas de zinco. Em todas as modalidades verificam-se níveis elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e danos oxidativos nas membranas. Nas plantas sem adição de corretivos, há a ativação do metabolismo secundário (PAL/compostos fenólicos/antocianinas), assim como da SOD e APX. Na modalidade com adição de cortiça, as plantas são menos tolerantes (menor IT) à presença de zinco, sendo isso também evidenciado pelos mecanismos que são ativos. Neste caso, a SOD também está ativa, originando a produção de peróxido e a única enzima antioxidante que está ativa e que indiretamente poderá ter efeito na remoção desta ROS é a GR. Para além disso, há a produção de ASA e de compostos fenólicos. Na modalidade SE, há também a ativação do metabolismo secundário como na modalidade S, assim como a ativação da CAT e produção de ASA.

Tem de se ter em consideração que outros mecanismos, que não foram determinados no presente estudo, podem estar a atuar na defesa da planta face ao stresse e que permitiriam fazer uma análise mais completa da resposta da planta.

#### 6.4.5.6. Avaliação da toxicidade induzida por Zn

Na **Tabela 6.32** apresentam-se os resultados para o Índice de Tolerância (IT), da parte edível das plantas de alface contaminadas com zinco que se desenvolveram em solo, com e sem adição de corretivos.

O IT diminui ligeiramente com o aumento da concentração de zinco presente na parte edível da alface. Nos resultados obtidos para o índice de tolerância existem valores inferiores a 50 %, relativamente ao controlo, para as plantas contaminadas com 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup>. Este comportamento observa-se para todas as modalidades (S, SC, SE), não existindo grandes variações entre os valores de IT.

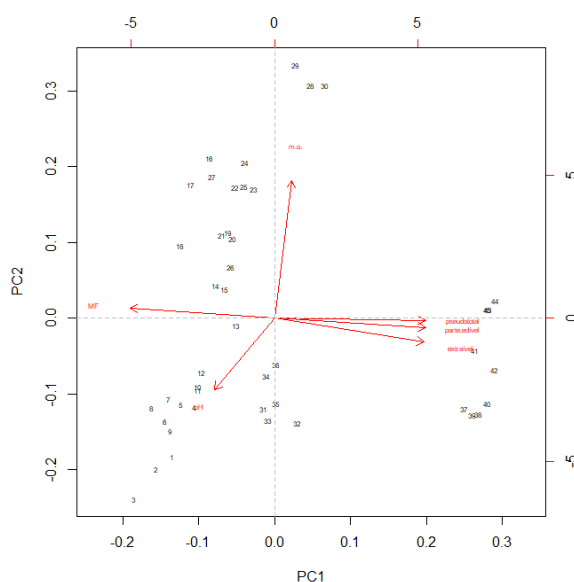


**Tabela 6.32** – Índice de tolerância da parte aérea, de plantas de alface M4E que se desenvolveram em solo, sujeitas a diferentes concentrações de Zn e com várias modalidades: solo sem adição de corretivos (S), solo com pó de cortiça (SC) e solo com estrume de cavalo (SE).

Modalidade	IT (%)				
	[Zn] (mg kg <sup>-1</sup> )				
	0	150	300	600	1200
S	100	91,53	76,80	70,64	23,83
SC	100	100,98	88,81	86,47	20,53
SE	100	98,71	87,18	82,41	30,64

O sombreado a cinza indica os valores de concentração de metal a partir dos quais o IT é inferior a 50 %, comparativamente ao controle

Para se avaliar a relação entre as variáveis estudadas realizou-se uma análise em componentes principais (ACP) (**Figura 6.52**). Nesta análise considerou-se 6 variáveis: parte edível (corresponde à concentração de Zn na parte edível, mg kg<sup>-1</sup> MS), pseudototal (corresponde à concentração de Zn na fração pseudototal, mg kg<sup>-1</sup> MS), extraível (corresponde à concentração de Zn na fração extraível, mg kg<sup>-1</sup> MS), pH, m.o. (matéria orgânica, %) e MF (massa fresca, g).



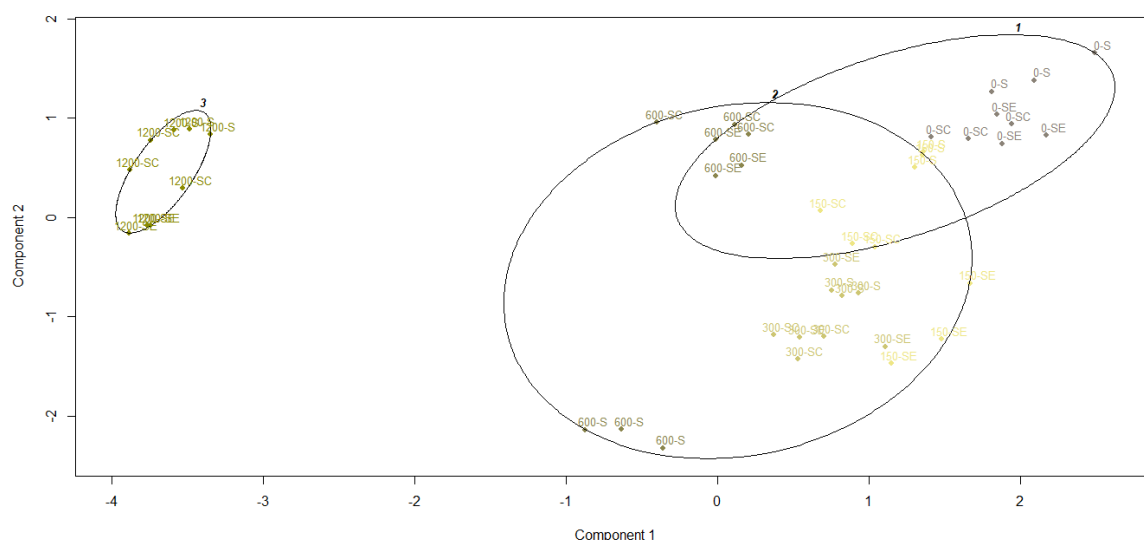
**Figura 6.52** – Análise em componentes principais realizada para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Zn (n=3), considerando 6 variáveis: *parte edível*, *pseudototal*, *extraível*, *pH*, *m.o.* e *MF*.

As variáveis estão representadas a vermelho: vetores paralelos, significa que as variáveis estão bem correlacionadas; vetores com o cosseno do ângulo superior a 90° indicam uma má correlação.



Observa-se que as variáveis que correspondem ao teor de Zn presente na fração pseudototal, extraível e na parte edível estão muito bem correlacionadas. A variável massa fresca tem um comportamento oposto a estas variáveis. Tal como verificado, um aumento na concentração de Zn na parte edível da alface leva a um decréscimo na massa fresca da planta. As variáveis m.o. e pH estão pouco correlacionadas com as restantes variáveis em estudo e apresentam um comportamento oposto, evidenciando que na presença de teores mais elevados de m.o., o pH diminui. A ACP é explicada num total de 82,67 % pela relação entre a componente principal 1 e a componente principal 2 (PC1 vs PC2).

Para se avaliar a toxicidade dos EPTs estudados realizou-se uma análise classificatória com o método de partição (PAM) que permitisse separar os indivíduos por classes (**Figura 6.53**), considerando-se as 6 variáveis referidas anteriormente.



**Figura 6.53** – Método de partição (PAM) realizado para os indivíduos expostos às diferentes concentrações de Zn ( $n=3$ ). Estas duas componentes explicam 82,67 % da variabilidade.

Os indivíduos estão apresentados com base na concentração de Zn (0, 150, 300, 600, 1200  $\text{mg kg}^{-1}$ ) e na modalidade aplicada (S- sem adição de corretivos; SC- adição de cortiça; SE- adição de estrume).

Existem três classes: (i) duas sobrepostas onde se encontram todos os indivíduos controle e contaminados com Zn (150, 300 e 600  $\text{mg Zn kg}^{-1}$ ), estando o controle relativamente afastado dos restantes indivíduos, e (ii) uma classe bem distinta onde se encontram os indivíduos contaminados com a concentração mais elevada (1200  $\text{mg Zn kg}^{-1}$ ) e que são diferentes de todos os outros. Esta separação por classes reflete que, efetivamente, é nestes indivíduos mais contaminados que se observam os efeitos de toxicidade do zinco, nomeadamente, uma diminuição acentuada da massa fresca da planta, uma maior acumulação de zinco e menores índices de tolerância.



### *Conclusões intercalares*

Os resultados demonstram que a presença destes dois corretivos orgânicos não tem influência na disponibilidade de Zn no solo na fração extraível. O pH apresenta uma tendência para diminuir com o aumento da concentração de Zn e este efeito é acompanhado por um maior teor de Zn extraível presente no solo.

A acumulação de Zn na planta de alface apresenta um comportamento linear e a adição dos corretivos orgânicos não tem o efeito desejável, não diminuindo a acumulação de Zn nas plantas mais contaminadas onde se adicionam corretivos.

Nos parâmetros vegetativos é possível verificar que existe uma diminuição do tamanho das plantas com o aumento da concentração de zinco no solo. As plantas de alface apresentam sintomas visíveis de toxicidade nas plantas mais contaminadas (menor massa fresca, coloração avermelhada), estando estes resultados de acordo com os valores baixos de IT obtidos.

Os teores de Zn presentes na parte aérea de plantas expostas a 150 e 300 mg Zn kg<sup>-1</sup> encontram-se abaixo dos valores normais de zinco presentes nas plantas, 15-200 mg Zn kg<sup>-1</sup> MS (Nagajyoti et al., 2010). Por outro lado, os valores obtidos nas plantas mais contaminadas com 600 e 1200 mg Zn kg<sup>-1</sup>, encontram-se acima desses valores. No entanto, através dos resultados de IDE obtidos no presente trabalho é possível verificar que os valores obtidos para todas as plantas contaminadas são bastante inferiores à dose de referência referida no presente trabalho.

Pode-se concluir que nestas condições de ensaio, a adição dos corretivos testados neste trabalho (estrume de cavalo e pó de cortiça), não diminuem o teor de Zn na fração extraível e não contribuem para a diminuição da acumulação de zinco pela planta.



## 6.5. Conclusões

Na tabela 6.33 encontra-se um resumo da acumulação de EPTs em plantas de alface M4E em solo.

A adição de corretivos orgânicos poderá fazer sentido em solos contaminados com cádmio, uma vez que no presente trabalho, a presença de cortiça e estrume provoca uma diminuição na quantidade de cádmio absorvida na parte edível da planta. No caso do Cr, Pb, Ni e Zn, aparentemente, a presença destes corretivos orgânicos não tem influência no teor acumulado pela planta na parte edível. É importante referir que a presença destes corretivos diminuiu a concentração de Ni na fração extraível, demonstrando que a adição de estrume e cortiça poderá vir a ter influência na disponibilidade destes EPT. Apesar de este efeito não se observar nestas condições de ensaio, não significa que se adicionarmos quantidades mais elevadas destes corretivos ou testarmos outra planta, o contrário não possa vir a suceder.

Pode-se concluir que é promissora a remediação de solos contaminados com cádmio pela aplicação destes corretivos orgânicos testados neste trabalho (estrume de cavalo e pó de cortiça), que são relativamente abundantes em Portugal, contribuindo para reduzir a acumulação de cádmio pelas plantas de alface. Nos restantes EPTs, deviam ter sido adicionadas quantidades mais elevadas de corretivos, apesar do ensaio prévio realizado, para se verificar se existe influência na fração extraível e na quantidade de EPT acumulado pela planta.

Neste tipo de estudo, é necessário ter em conta que o extratante “mais eficaz” ou que extrai quantidades mais elevadas de EPTs não é, necessariamente, aquele que melhor está relacionado com o teor disponível para a planta. No entanto, o método utilizado para determinar a fração extraível (com o uso de  $\text{CaCl}_2$ ), não parece ser o mais adequado para relacionar os teores extraíveis de EPTs e os biodisponíveis, ou seja, que são efetivamente acumulados pela planta de alface. Em estudos posteriores seria aconselhável a utilização de outros extratantes como o acetato de sódio, nitrato de sódio ou nitrato de amónio, entre outros, e adequar essa extração a cada elemento em estudo.

A concentração de EPT presente na parte edível da planta de alface ultrapassa os valores permitidos por lei, no caso do Cd e Pb, e os níveis normais em plantas para o Cr, Ni e Zn (à exceção da contaminação com 150 e 300 mg Zn  $\text{kg}^{-1}$ ).

A presença de cádmio na alface apresenta risco associado à ingestão no caso de todas as plantas contaminadas com este EPT. A exposição de plantas de alface a uma concentração



inferior ( $1,5 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ) ao valor limite de referência da concentração de metais pesados nos solos neutros ( $3,0 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ), também resulta numa acumulação significativa e superior ao valor permitido por lei deste elemento em hortícolas de folha. Para além disso, no presente estudo todas as plantas contaminadas com cádmio apresentam valores de IDE superiores à dose de referência referida no presente trabalho.

No caso do chumbo é possível verificar que os valores obtidos para todas as plantas contaminadas com chumbo ultrapassam o limite máximo permitido pela legislação em vigor para hortícolas de folha. É importante referir que as plantas que cresceram num solo com uma contaminação inferior ( $150 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ ) ao valor de referência ( $300 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ ), apresentam risco de contaminação da cadeia alimentar, uma vez que a quantidade acumulada é superior ao valor limite permitido. No entanto, no presente estudo os valores de IDE obtidos para as plantas contaminadas com chumbo, à exceção das plantas contaminadas com  $150 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ , encontram-se acima da dose de referência referida no presente trabalho, podendo haver risco associado à exposição ao chumbo para a saúde do ser humano.

Nas plantas contaminadas com Cr, Ni e Zn, apesar dos níveis presentes nas plantas de alface, não existe risco associado porque os valores de IDE obtidos são inferiores à dose de referência recomendada.

Através do presente estudo, é possível verificar que esta cultivar de alface não deve ser cultivada em solos contaminados principalmente com Cd e Pb, uma vez que não apresenta sintomas evidentes de toxicidade e acumula quantidades excessivas e prejudiciais destes elementos.



Tabela 6.33 – Resumo da avaliação da acumulação de Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn em plantas de alface M4E em solo.

Variável	Cd	Cr	Pb	Ni	Zn
Fração extraível	1,92, 1,91 e 1,82 %, (S, SC e SE) sem diferenças significativas	0,030, 0,028 e 0,025 % (S, SC e SE) tendência ↓Cr extraível sem diferenças significativas	0,059, 0,067 e 0,072 % (S, SC e SE) sem diferenças significativas	2,34, 2,21 e 2,06 % (S, SC e SE) tendência ↓Ni extraível 300 mg Ni kg <sup>-1</sup> : ↓ SE	2,27, 2,37 e 2,14 % (S, SC e SE) sem diferenças significativas
pH m.o.	sem efeito ↑ SC, SE	↓ [S] maiores S, SC, SE ↑ SC, SE	sem efeito ↑ SC, SE	↓ SC, SE ↑ SC, SE	↓ [S] maiores S, SC, SE ↑ SC, SE
Acumulação	hiperbólico	linear	linear	hiperbólico	linear
[EPT]	parte aérea: (12 mg kg <sup>-1</sup> ) S: 93,52±1,07 mg Cd kg <sup>-1</sup> SC: 79,80±3,26 mg Cd kg <sup>-1</sup> (↓ 14,7 %) SE: 72,01±1,11 mg Cd kg <sup>-1</sup> (↓ 23,0 %)	parte aérea: (800 mg kg <sup>-1</sup> ) S: 5,20±0,43 mg Cr kg <sup>-1</sup> SC: 5,86±0,45 mg Cr kg <sup>-1</sup> (↑ 12,6 %) SE: 6,06±0,21 mg Cr kg <sup>-1</sup> (↑ 16,5 %)	parte aérea: S: 9,58±0,33 mg Pb kg <sup>-1</sup> SC: 10,77±1,03 mg Pb kg <sup>-1</sup> (↑ 12,4 %) SE: 10,65±0,81 mg Pb kg <sup>-1</sup> (↑ 11,2 %)	parte aérea: S: 68,22±7,56 mg Ni kg <sup>-1</sup> SC: 81,74±10,99 mg Ni kg <sup>-1</sup> (↑10,6-19,8 %) SE: 78,35±10,68 mg Ni kg <sup>-1</sup> (↑ 13,4-14,9 %)	parte aérea: S: 533,52±7,43 mg Zn kg <sup>-1</sup> SC: 532,54±16,06 mg Zn kg <sup>-1</sup> (↓0,2 %) SE: 608,10±34,31 mg Zn kg <sup>-1</sup> (↑ 14,0 %)
[valores permitidos por lei] – Cd, Pb [valores normais para hortícolas considerados não contaminados] – Ni, Zn, Cr	1,5 mg Cd kg <sup>-1</sup> S: 5,82±0,13 mg Cd kg <sup>-1</sup> MF SC: 6,78±1,35 mg Cd kg <sup>-1</sup> MF SE: 6,53±0,09 mg Cd kg <sup>-1</sup> MF 12 mg Cd kg <sup>-1</sup> S: 30,17±0,34 mg Cd kg <sup>-1</sup> MF SC: 25,74±1,05 mg Cd kg <sup>-1</sup> MF SE: 23,23±0,36 mg Cd kg <sup>-1</sup> MF ≥ 0,2 mg Cd kg <sup>-1</sup> MF	100 mg Cr kg <sup>-1</sup> S: 2,23±0,10 mg Cr kg <sup>-1</sup> MS SC: 2,34±0,15 mg Cr kg <sup>-1</sup> MS SE: 2,25±0,03 mg Cr kg <sup>-1</sup> MS 800 mg Cr kg <sup>-1</sup> S: 5,20±0,43 mg Cr kg <sup>-1</sup> MS SC: 5,86±0,45 mg Cr kg <sup>-1</sup> MS SE: 6,06±0,21 mg Cr kg <sup>-1</sup> MS ≥ 0,2- 1,0 mg Cr kg <sup>-1</sup> MS	150 mg Pb kg <sup>-1</sup> S: 0,69±0,11 mg Pb kg <sup>-1</sup> MF SC: 0,80±0,06 mg Pb kg <sup>-1</sup> MF SE: 1,04±0,10 mg Pb kg <sup>-1</sup> MF 1200 mg Pb kg <sup>-1</sup> S: 3,55±0,12 mg Pb kg <sup>-1</sup> MF SC: 3,99±0,38 mg Pb kg <sup>-1</sup> MF SE: 3,95±0,30 mg Pb kg <sup>-1</sup> MF ≥ 0,30 mg Pb kg <sup>-1</sup> MF	37,5 mg Ni kg <sup>-1</sup> S: 22,70±4,10 mg Ni kg <sup>-1</sup> MS SC: 30,23±8,36 mg Ni kg <sup>-1</sup> MS SE: 39,70±8,32 mg Ni kg <sup>-1</sup> MS 300 mg Ni kg <sup>-1</sup> S: 68,22±7,56 mg Ni kg <sup>-1</sup> MS SC: 81,74±10,99 mg Ni kg <sup>-1</sup> MS SE: 78,35±10,68 mg Ni kg <sup>-1</sup> MF ≥ 1,0 mg; 1-10 mg Ni kg <sup>-1</sup> MS	150 mg Zn kg <sup>-1</sup> e 300 mg Zn kg <sup>-1</sup> < 15-200 mg Zn kg <sup>-1</sup> MS 600 mg Zn kg <sup>-1</sup> S: 218,02±7,93 mg Zn kg <sup>-1</sup> MS SC: 256,38±11,51 mg Zn kg <sup>-1</sup> MS SE: 288,38±16,09 mg Zn kg <sup>-1</sup> MS 1200 mg Zn kg <sup>-1</sup> S: 533,52±7,43 mg Zn kg <sup>-1</sup> MS SC: 535,54±16,06 mg Zn kg <sup>-1</sup> MS SE: 608,10±34,31 mg Zn kg <sup>-1</sup> MS ≥ 15-200 mg Zn kg <sup>-1</sup> MS
FT	S: constante (8,4) SC: ↓ (7,0) SE: ↓↓ (5,9)	S: ↓ (0,007) SC: ↓ (0,008) SE: ↓ (0,008) (valores muito baixos)	S (0,013), SC (0,016), SE (0,018): constante	S: ↓ (0,26) SC: ↓ (0,32) SE: ↓ (0,33)	S (0,55), SC (0,56), SE (0,65): constante
Biomassa	3	↓significativa 85,0, 70,8 e 80,9 % S, SC e SE	Sem diferenças significativas: 150,300 e 600 mg Pb kg <sup>-1</sup> ↓significativa:1200 mg Pb kg <sup>-1</sup> 39,1, 28,9 e 24,6 % S, SC e SE	Sem diferenças significativas 7,5 % SE ↑ 1,3 % - S, 6,0 % - SC	↓significativa S: ≥ 300 mg Zn kg <sup>-1</sup> SC, SE: ≥ 1200 mg Zn kg <sup>-1</sup> 76,2, 79,5 e 69,4 % S, SC e SE
Sintomas visíveis de toxicidade	Sem danos visíveis	Com danos visíveis: diminuição evidente no tamanho da planta; aparecimento de coloração avermelhada nas folhas	Sem danos visíveis	Sem danos visíveis	Com danos visíveis: diminuição evidente no tamanho da planta; aparecimento de coloração avermelhada nas folhas
IDE (ingestão diária estimada)	7,47-9,70 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> 1,87-2,18 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> > 1 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> com risco adverso	0,37-0,43 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> 0,18-0,20 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> < 1,5 mg Cr kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> sem risco	1,14-1,28 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> 0,22-0,34 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> < 0,35 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> sem risco	10,44-12,51 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> 3,47-6,08 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> < 20 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> sem risco	37,21-42,49 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> 5,87-6,03 µg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> < 10 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> sem risco
IT	IT menor (6 e 12 mg Cd kg <sup>-1</sup> ) S (menos tolerantes) < SC=SE	IT ↓↓ IT < 50 % - 800 mg Cr kg <sup>-1</sup> (S-14,97%, SC-29,19%, SE-19,06%),	IT menor (1200 mg Pb kg <sup>-1</sup> )	IT ±100%	IT ↓ IT < 50 % - 1200 mg Zn kg <sup>-1</sup> (S-23,83%, SC-20,53%, SE-30,64%)





## 6.6. Referências Bibliográficas

- Abdu, N., Agbenin, J. O., Buerkert, A. (2011). Phytoavailability, human risk assessment and transfer characteristics of cadmium and zinc contamination from urban gardens in Kano, Nigeria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**, 2722-2730.
- Abdu, N., Agbenin, J. O., Buerkert, A. (2012). Fractionation and mobility of cadmium and zinc in urban vegetable gardens of Kano, northern Nigeria. *Environ Monit Assess* **184**, 2057-66.
- Abedi-Koupai, J., Mollaei, R., Eslamian, S. S. (2015). The effect of pumice on reduction of cadmium uptake by spinach irrigated with wastewater. *Ecohydrology & Hydrobiology*.
- Adamo, P., Iavazzo, P., Albanese, S., Agrelli, D., De Vivo, B., Lima, A. (2014). Bioavailability and soil-to-plant transfer factors as indicators of potentially toxic element contamination in agricultural soils. *Science of The Total Environment* **500-501**, 11-22.
- Adrees, M., Ali, S., Iqbal, M., Aslam Bharwana, S., Siddiqi, Z., Farid, M., Ali, Q., Saeed, R., Rizwan, M. (2015). Mannitol alleviates chromium toxicity in wheat plants in relation to growth, yield, stimulation of anti-oxidative enzymes, oxidative stress and Cr uptake in sand and soil media. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **122**, 1-8.
- Agnieszka, B., Tomasz, C., Jerzy, W. (2014). Chemical properties and toxicity of soils contaminated by mining activity. *Ecotoxicology* **23**, 1234–1244.
- Ahmad, M., Soo Lee, S., Yang, J. E., Ro, H.-M., Han Lee, Y., Sik Ok, Y. (2012). Effects of soil dilution and amendments (mussel shell, cow bone, and biochar) on Pb availability and phytotoxicity in military shooting range soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **79**, 225-231.
- Ahmad, M. S. A., Hussain, M., Saddiq, R., Alvi, A. K. (2007). Mungbean: A nickel indicator, accumulator or excluder? *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **78**, 319–324.
- Ahmed, F., Hossain, M., Abdullah, A. T., Akbor, M., Ahsan, M. (2016). Public health risk assessment of chromium intake from vegetable grown in the wastewater irrigated site in Bangladesh. *Pollution* **2**, 425-432.
- Akoumianakis, K. A., Passam, H. C., Barouchas, P. E., Moustakas, N. K. (2008). Effect of cadmium on yield and cadmium concentration in the edible tissues of endive (*Cichorium endivia* L.) and rocket (*Eruca sativa* Mill.). *Journal of Food Agriculture & Environment* **6**, 206-209.
- Albanese, S., Sadeghi, M., Lima, A., Cicchella, D., Dinelli, E., Valera, P., Falconi, M., Demetriades, A., De Vivo, B., Team, T. G. P. (2015). GEMAS: Cobalt, Cr, Cu and Ni distribution in agricultural and grazing land soil of Europe. *Journal of Geochemical Exploration* **154**, 81-93.
- Ali, H., Khanb, E., Sajad, M. (2013). Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* **91** 869–881.
- Alloway, B. J. (2004). Contamination of soils in domestic gardens and allotments: a brief overview. *Land Contamination & Reclamation* **12**, 179-187.
- Alloway, B. J. (2008). "Zinc in Soils and Crop Nutrition," International Fertilizer Industry Association, Paris, France, International Zinc Association Brussels.
- Alloway, B. J. (2009). Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. . *Environmental Geochemistry & Health* **31**, 537–548.
- Alloway, B. J. (2013). "Heavy Metals in Soils," 3rd/Ed. Springer.



- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A. P., Fernandes, R. M., Varennes, A., Vallini, G., Durate, E., Cunha-Queda, A. C. (2008). Evaluation of tests to assess the quality of mine-contaminated soils. *Environmental Geochemistry and Health* **30**, 95-99.
- Amato-Lourenco, L. F., Moreira, T. C. L., de Oliveira Souza, V. C., Barbosa, F., Saiki, M., Saldiva, P. H. N., Mauad, T. (2016). The influence of atmospheric particles on the elemental content of vegetables in urban gardens of Sao Paulo, Brazil. *Environmental Pollution* **216**, 125-134.
- Amin, N.-u., Hussain, A., Alamzeb, S., Begum, S. (2013). Accumulation of heavy metals in edible parts of vegetables irrigated with waste water and their daily intake to adults and children, District Mardan, Pakistan. *Food Chemistry* **136**, 1515-1523.
- Antibachi, D., Kelepertzis, E., Kelepertsis, A. (2012). Heavy metals in agricultural soils of the Mouriki-Thiva area (central Greece) and environmental impact implications. *Soil Sediment Contam. Int. J.* **21**, 434-450.
- Antisari, L. V., Orsini, F., Marchetti, L., Vianello, G., Gianquinto, G. (2015). Heavy metal accumulation in vegetables grown in urban gardens. *Agronomy for Sustainable Development* **35**, 1139-1147.
- Antoniadis, V., Shaheen, S. M., Boersch, J., Frohne, T., Laing, G. D., Rinklebe, J. (2017). Bioavailability and risk assessment of potentially toxic elements in garden edible vegetables and soils around a highly contaminated former mining area in Germany. *Journal of Environmental Management* ( ) **186** 192-200.
- Antonious, G. F., Kochhar, T. S., Coolong, T. (2012). Yield, quality, and concentration of seven heavy metals in cabbage and broccoli grown in sewage sludge and chicken manure amended soil. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* **47**, 1955-1965.
- Aref, F. (2011). Concentration and uptake of zinc and boron in corn leaf as affected by zinc sulfate and boric acid fertilizers in a deficient soil. *Life Science Journal* **8**, 26–32.
- Ashraf, A., Bibi, I., Niazi, N. K., Ok, Y. S., Murtaza, G., Shahid, M., Kunhikrishnan, A., Mahmood, T. (2017). Chromium(VI) sorption efficiency of acid-activated banana peel over organo-montmorillonite in aqueous solutions. *Int. J. Phytoremediat.*
- ATSDR (2005). Toxicological Profile for Zinc. (D. o. P. H. a. H. S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Toxicology and Environmental Medicine, Public Health Service., ed.). Atlanta, GA, USA.
- ATSDR (2012). Agency for Toxic Substance and Disease Registry, U.S. toxicological profile for cadmium. Department of Health and Humans Services. (C. f. D. C. Public Health Service, ed.), Atlanta, Georgia, USA.
- ATSDR (2013a). Cadmium Toxicity - What Are the U.S. Standards for Cadmium Exposure?
- ATSDR (2013b). Chromium Toxicity: what Are the Physiologic Effects of Chromium Exposure?
- ATSDR, A. f. T. S. a. D. R. (2011). Chromium Toxicity - What are the Standards and Regulations for Chromium Exposure? (C. S. i. E. M. (CSEM), ed.), pp. 1-67.
- ATSDR, A. F. T. S. A. D. R. (2017). Lead Toxicity - What Are U.S. Standards for Lead Levels? In "CASE STUDIES IN ENVIRONMENTAL MEDICINE (CSEM) ", pp. 1-185.
- ATSRD, A. f. T. S. a. D. R. D. (2012). Toxicological Profile for Chromium. (U. S. D. O. H. A. H. S. P. H. Service, ed.), pp. 417-425, Atlanta, Georgia
- Attanayake, C. P., Hettiarachchi, G. M., Harms, A., Presley, D., Martin, S., Pierzynski, G. M. (2014). Field evaluations on soil plant transfer of lead from an urban garden soil. *J. Environ. Qual.* **43**, 475–487.



- Attanayake, C. P., Hettiarachchi, G. M., Martin, S., Pierzynski, G. M. (2015). Potential bioavailability of lead, arsenic, and polycyclic aromatic hydrocarbons in compost-amended urban soils. *J. Environ. Qual.* **44**, 930–944.
- Augustsson, A. L. M., Uddh-Söderberg, T. E., Hogmalm, K. J., Filipsson, M. E. M. (2015). Metal uptake by homegrown vegetables – The relative importance in human health risk assessments at contaminated sites. *Environmental Research* **138**, 181-190.
- Avudainayagam, S., Megharaj, M., Owens, G., Kookana, R. S., Chittleborough, D., Naidu, R. (2003). Chemistry of Chromium in Soils with Emphasis on Tannery Waste Sites. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer*, 53-91.
- Azevedo, R. A., Gratão, P. L., Monteiro, C. C., Carvalho, R. F. (2012). What is new in the research on cadmium-induced stress in plants? *Food and Energy Security* **1**, 133-140.
- Aziz, M. A., Ahmad, H. R., Corwin, D. L., Sabir, M., Hakeem, K. R., Öztürk, M. (2017). Influence of farmyard manure on retention and availability of nickel, zinc and lead in metal-contaminated calcareous loam soils. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* **25**, 289-296.
- Babula, P., Adam, V., Opatrilova, R., Zehnalek, J., Havel, L., Kizek, R. (2008). Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters* **6**, 189-213.
- Bai, Y., Gu, C., Tao, T., Chen, G., Shan, Y. (2012). Straw incorporation increases solubility and uptake of cadmium by rice plants. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science* **63**, 193-199.
- Balabanova, B., Stafilov, T., Šajn, R., Andonovska, K. B. (2017). Quantitative assessment of metal elements using moss species as biomonitors in downwind area of lead-zinc mine. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **52**, 290–301.
- Balasoïu, C. F., Zagury, G. J., Deschenes, L. (2001). Partitioning and speciation of chromium, copper, and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil composition. *Sci. Total Environ.* **280**, 239-255.
- Baldantoni, D., Morra, L., Zaccardelli, M., Alfani, A. (2016a). Cadmium accumulation in leaves of leafy vegetables. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **123**, 89–94.
- Baldantoni, D., Morra, L., Zaccardelli, M., Alfani, A. (2016b). Cadmium accumulation in leaves of leafy vegetables. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **123**, 89-94.
- Ball, J. W., Izbicki, J. (2004). Occurrence of hexavalent chromium in ground water in the western Mojave Desert, California. *Appl. Geochem.* **19**, 1123-1135.
- Ballesteros, S., Rincón, J. M., Rincón-Mora, B., Jordán, M. (2016). Vitrification of urban soil contamination by hexavalent chromium. *J. Geochem. Explor.* **174**, 132-139.
- Banks, M. K., Schwab, A. P., Henderson, C. (2006). Leaching and reduction of chromium in soil as affected by soil organic content and plants. *Chemosphere* **62**, 255-264.
- Baran, A. (2013). Assessment of Zea mays Sensitivity to Toxic Content of Zinc in Soil. *Pol. J. Environ. Stud.* **22**, 77-83.
- Barthel, S., Isendahl, C. (2013). Urban gardens, agriculture, and water management: Sources of resilience for long-term food security in cities. *Ecological Economics* **86**, 224-234.
- Beccaloni, E., Vanni, F., Beccaloni, M., Carere, M. (2013). Concentrations of arsenic, cadmium, lead and zinc in homegrown vegetables and fruits: Estimated intake by population in an industrialized area of Sardinia, Italy. *J. Microchem* **107**, 190–195.
- Bechet, B., Joimel, S., Jean-Soro, L., Hursthouse, A., Agboola, A., Leitão, T. E., Costa, H., do Rosário Cameira, M., Le Guern, C., Schwartz, C., Lebeau, T. (2016). Spatial variability



- of trace elements in allotment gardens of four European cities: assessments at city, garden, and plot scale. *Journal of Soils and Sediments*, 1-16.
- Bermudez, G. M. A., Jasan, R., Pla, R., Pignata, M. L. (2012). Heavy metals and trace elements in atmospheric fall-out: Their relationship with topsoil and wheat element composition. *Journal of Hazardous Materials* **213-214**, 447-456.
- Bernard, A. (2008). Cadmium & its adverse effects on human health. *Indian J. Med. Res.* **128**, 557–564.
- Bešter, P. K., Lobnik, F., Eržen, I., Kastelec, D., Zupan, M. (2013). Prediction of cadmium concentration in selected home-produced vegetables. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **96**, 182-190.
- Beyer, W. N., Green, C. E., Beyer, M., Chaney, R. L. (2013). Phytotoxicity of zinc and manganese to seedlings grown in soil contaminated by zinc smelting. *Environmental Pollution* **179**, 167-176.
- Bini, C., Maleci, L., Wahsha, M. (2017). Potentially toxic elements in serpentine soils and plants from Tuscany (Central Italy). A proxy for soil remediation. *Catena* **148**, 60-66.
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M. B., Scheckel, K. (2014). Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize? *Journal of Hazardous Materials* **266**, 141-166.
- Bolan, N. S., Adriano, D., Natesan, R., Koo, B.-J. (2003). Effects of organic amendments on the reduction and phytoavailability of chromate in mineral soil. *J. Environ. Qual.* **32**, 120-128.
- Bolan, N. S., Thiagarajan, S. (2001). Retention and plant availability of chromium in soils as affected by lime and organic matter amendments. *Soil Res.* **39**, 1091-1103.
- Boussen, S., Soubrand, M., Bril, H., Ouerfelli, K., Abdeljaouad, S. (2013). Transfer of lead, zinc and cadmium from mine tailings to wheat (*Triticum aestivum*) in carbonated Mediterranean (Northern Tunisia) soils. *Geoderma* **192**, 227-236.
- Bravo, S., Amorós, J. A., Pérez-de-los-Reyes, C., García, F. J., Moreno, M. M., Sánchez-Ormeño, M., Higuera, P. (2017). Influence of the soil pH in the uptake and bioaccumulation of heavy metals (Fe, Zn, Cu, Pb and Mn) and other elements (Ca, K, Al, Sr and Ba) in vine leaves, Castilla-La Mancha (Spain). *Journal of Geochemical Exploration* **174**, 79-83.
- Bretzel, F., Calderisi, M. (2006). Metal contamination in urban soils of coastal Tuscany (Italy). *Environmental Monitoring and Assessment* **118**, 319-335.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist* **173**, 677-702.
- Broadway, A., Cave, M. R., Wragg, J., Fordyce, F. M., Bewley, R. J., Graham, M. C., Ngwenya, B. T., Farmer, J. G. (2010). Determination of the bioaccessibility of chromium in Glasgow soil and the implications for human health risk assessment. *Sci. Total Environ.* **409**, 267-277.
- Brown, S., Carpenter, A., Beecher, N. (2010). Calculator tool for determining greenhouse gas emissions for biosolids processing and end use. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 9509–9515.
- Brown, S. L., Chaney, R. L., Hettiarachchi, G. M. (2016). Lead in Urban Soils: A Real or Perceived Concern for Urban Agriculture? *Journal of Environmental Quality*, 26-36.
- Bucher, A. S., Schenk, M. K. (2000). Toxicity level for phytoavailable zinc in compost-peat substrates. *Scientia Horticulturae* **83**, 339–352.
- Canada, H. (2007). Non-Carcinogen Tolerable Daily Intake (TDI) Values from Health Canada.



- Cao, X. D., Ma, L. Q., Tu, C. (2004). Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environmental Pollution* **128**, 317-325.
- Castro, E., Mañas, P., De las Heras, J. (2009). A comparison of the application of different waste products to a lettuce crop: Effects on plant and soil properties. *Scientia Horticulturae* **123**, 148-155.
- CCME (2015). Canadian soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health. (C. C. o. M. o. t. Environment, ed.), Winnipeg.
- Cecchi, M., Dumat, C., Alric, A., Felix-Faure, B., Pradere, P., Guiresse, M. (2008). Multimetal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma* **144**, 1–2.
- Cempel, M., Nikel, G. (2006). Nickel: A review of its sources and Environmental Toxicology. *Polish J. of Environ. Stud.* **15**, 375-382.
- Centers for Disease Control and Prevention, C. (2017). Lead.
- Chaney, R. L. (2015). How Does Contamination of Rice Soils with Cd and Zn Cause High Incidence of Human Cd Disease in Subsistence Rice Farmers. . *Curr. Pollut. Rep.* **1**, 13–22.
- Chang, C. Y., Yu, H. Y., Chen, J. J., Li, F. B., Zhang, H. H., Liu, C. P. (2014). Accumulation of heavy metals in leaf vegetables from agricultural soils and associated potential health risks in the Pearl River Delta, South China. *Environmental Monitoring and Assessment* **186**, 1547–1560.
- Chen, C., Huang, D., Liu, J. (2009). Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects. *Clean* **37** 304–313.
- Chen, H.-S., Huang, Q.-Y., Liu, L.-N., Cai, P., Liang, W., Li, M. (2010). Poultry Manure Compost Alleviates the Phytotoxicity of Soil Cadmium: Influence on Growth of Pakchoi (*Brassica chinensis* L.). *Pedosphere* **20**, 63-70.
- Chen, H., Teng, Y., Lu, S., Wang, Y., Wang, J. (2015). Contamination features and health risk of soil heavy metals in China. *Science of The Total Environment* **512-513**, 143-153.
- Chen, Q. Y., Brocato, J., Laulicht, F., Costa, M. (2017). Mechanisms of Nickel Carcinogenesis. In "Essential and Non-essential Metals" (Z. J. e. Mudipalli A., ed.). Molecular and Integrative Toxicology, Humana Press, Cham
- Chen, W., Li, L., Chang, A., Wu, L., Kwon, S., Bottoms, R. (2008). Modeling uptake kinetics of cadmium by field-grown lettuce. *Environmental Pollution* **152**
- Cheng, H., Zhou, T., Li, Q., Lu, L., Lin, C. (2014). Anthropogenic Chromium Emissions in China from 1990 to 2009. *PLOS ONE* **9**, 1-9.
- Cheng, Z. Q., Lee, L., Dayan, S., Grinshtein, M., Shaw, R. (2011). Speciation of heavy metals in garden soils: Evidences from selective and sequential chemical leaching. *J. Soils Sediments* **11**, 628–638.
- Cherfi, A., Gaci, S. A. O. (2014). Food survey: Levels and potential health risks of chromium, lead, zinc and copper content in fruits and vegetables consumed in Algeria. *Food and Chemical Toxicology* **70**, 48-53.
- Choppala, G., Kunhikrishnan, A., Seshadri, B., Park, J. H., Bush, R., Bolan, N. (2016). Comparative sorption of chromium species as influenced by pH, surface charge and organic matter content in contaminated soils. *J. Geochem In Press*.
- Choppala, G., Saifullah, Bolan, N., Bibi, S., Iqbal, M., Rengel, Z., Kunhikrishnan, A., Ashwath, N., Ok, Y. S. (2014). Cellular Mechanisms in Higher Plants Governing Tolerance to Cadmium Toxicity. *Critical Reviews in Plant Sciences* **33**, 374-391.





- Chubar, N., Carvalho, J. R., Correia, M. J. N. (2003). Cork biomass as biosorbent for Cu(II), Zn(II) and Ni(II). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **230**, 57-65.
- Clemens, S., Aarts, M. G. M., Thomine, S., Verbruggen, N. (2013). Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science* **18**, 92-99.
- Clemens, S., Ma, J. F. (2016). Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop Plants and Foods. *Annual Review of Plant Biology* **67**, 489-512.
- Clemente, R., Escolar, A., Bernal, M. P. (2006). Heavy metals fractionation and organic matter mineralisation in contaminated calcareous soil amended with organic materials. *Bioresource Technology* **97**, 1894-1901.
- Comission Regulation (EU) 488/2014 (2014). Amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs (O. J. L. 138/75, ed.).
- Commission Regulation (EU) 1005/2015 (2015). Amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of lead in certain foodstuffs. (O. J. L. 161/9, ed.).
- Council on Environmental Health, C. (2016). Prevention of Childhood Lead Toxicity. *Pediatrics* **138**, 2016-1493.
- Cruz, N., Rodrigues, S. M., Coelho, C., Carvalho, L., Duarte, A. C., Pereira, E., Römken, P. F. A. M. (2014). Urban agriculture in Portugal: Availability of potentially toxic elements for plant uptake. *Applied Geochemistry* **44**, 27-37.
- Dabrin, A., Durand, C. L., Garric, J., Geffard, O., Ferrari, B. J. D., Coquery, M. (2012). Coupling geochemical and biological approaches to assess the availability of cadmium in freshwater sediment. *Sci Total Environ* **424**, 308–315.
- Dai, L.-P., Dong, X.-J., Ma, H.-H. (2012). Molecular mechanism for cadmium-induced anthocyanin accumulation in *Azolla imbricata*. *Chemosphere* **87**, 319-325.
- Dao, L., Morrison, L., Zhang, H., Zhang, C. (2014). Influences of traffic on Pb, Cu and Zn concentrations in roadside soils of an urban park in Dublin, Ireland. *Environ Geochem Health* **36**, 333.
- Datko-Williams, L., Wilkie, A., Richmond-Bryant, J. (2014). Analysis of U.S. soil lead (Pb) studies from 1970 to 2012. *Science of The Total Environment* **468–469**, 854-863.
- Deckers, J., Steinnes, E. (2004). State of the art on soil-related geo-medical issues in the world. *Advances in Agronomy* **84**, 1–35.
- Decreto-Lei (n.º 103/2015 ). de 15 de Junho. Diário da Republica n.º 114 - 1ª Série. (M. d. Economia, ed.), Lisboa.
- Decreto-Lei (n.º 236/98 ). de 1 de Agosto. Diário da Republica n.º 176 - 1ª Série A (M. d. Ambiente, ed.), Vol. Lisboa, Lisboa.
- Decreto-lei (n.º 276/2009). Diário da República, 1.ª série — N.º 192 — 2 de Outubro de 2009 (d. O. d. T. e. d. D. R. Ministério do Ambiente, ed.), Lisboa.
- Defoe, P. P., Hettiarachchi, G. M., Benedict, C., Martin, S. (2014). Safety of gardening on lead and arsenic contaminated urban brownfields. *J. Environ. Qual.* **43**, 2064–2078.
- Degryse, F., Shahbazi, A., Verheyen, L., Smolders, E. (2012). Diffusion limitations in root uptake of cadmium and zinc, but not nickel, and resulting bias in the Michaelis constant. *Plant Physiol.* **160**, 1097-1109.
- Denkhaus, E., Salnikow, K. (2002). Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. Critical Reviews. *Oncology–Hematology* **42**, 35–56.
- Di Giuseppe, D., Melchiorre, M., Faccini, B., Ferretti, G., Coltorti, C. (2017). Effects of middle-term land reclamation on nickel soil-water interaction: a case study from reclaimed salt marshes of Po River Delta, Italy. *Environ Monit Assess*, 189: 523.



- Dias-Ferreira, C., Kirkelund, G. M., Ottosen, L. M. (2015). Ammonium citrate as enhancement for electrodyalytic soil remediation and investigation of soil solution during the process. *Chemosphere* **119**, 889-895.
- Ding, C., Li, X., Zhang, T., Ma, Y., Wang, X. (2014). Phytotoxicity and accumulation of chromium in carrot plants and the derivation of soil thresholds for Chinese soils. *Ecotoxicol Environ Saf* **108**, 179-86.
- Diretiva (98/83/CE). de 3 de Novembro de 1998 - relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. (J. O. d. C. Europeias, ed.).
- Diwan, H., Ahmad, A., Iqbal, M. (2010). Chromium-Induced Modulation in the Antioxidant Defense System During Phenological Growth Stages of Indian Mustard. *International Journal of Phytoremediation* **12**, 142-158.
- Dokou, Z., Karagiorgi, V., Karatzas, G. P., Nikolaidis, N. P., Kalogerakis, N. (2015). Large scale groundwater flow and hexavalent chromium transport modeling under current and future climatic conditions: the case of Asopos River Basin. *Environ Sci Pollut Res*
- Domańska, J., Badora, A., Filipek, T. (2015). The sensitivity of Brassica napus ssp. Oleifera to cadmium (Cd) and lead (Pb) contamination at different pH of mineral and organic soils. *Journal of Elementology* **20**, 59-71.
- Douay, F., Roussel, H., Fourrier, H., Heyman, C., Chateau, G. (2007). Investigation of heavy metal concentrations on urban soils, dust and vegetables nearby a former smelter site in Mortagne du Nord, Northern France. *Journal of Soils and Sediments* **7**, 143-146.
- Dumat, C., Quenea, K., Bermond, A., Toinen, S., Benedetti, M. F. (2006). Study of the trace metal ion influence on the turnover of soil organic matter in cultivated contaminated soils. *Environ Pollut* **142**, 521–529.
- Dunnett, N., Qasim, M. (2000). Perceived Benefits to Human Well-being of Urban Gardens. *HortTechnology* **10**, 40-45.
- Duplay, J., Semhi, K., Errais, E., Imfeld, G., Babcsanyi, I., Perrone, T. (2014). Copper, zinc, lead and cadmium bioavailability and retention in vineyard soils (Rouffach, France): the impact of cultural practices. *Geoderma* **230–231**, 318–328.
- Economou-Eliopoulos, M., Megremi, I., Atsarou, C., Theodoratou, C., Vasilatos, C. (2013). Spatial evolution of the chromium contamination in soils from the Assopos to Thiva Basin and C. Evia (Greece) and potential source (s): anthropogenic versus natural processes. *Geosciences* **3**, 140-158.
- EFSA, A. E. F. S. (2012). Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal* **10**.
- EFSA, E. F. S. A. (2006). TOLERABLE UPPER INTAKE LEVELS FOR VITAMINS AND MINERALS (N. a. A. Scientific Committee on Food Scientific Panel on Dietetic Products, ed.).
- EFSA, E. P. o. C. i. t. F. C. (2015). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water. *EFSA Journal* **13**.
- EFSA, E. P. o. D. P. N. A. (2014a). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for zinc. *EFSA Journal* **12**.
- EFSA, P. o. C. i. t. F. C. (2010). Scientific Opinion on Lead in Food. *EFSA Journal* **8**.
- EFSA, P. o. C. i. t. F. C. (2011). Statement on tolerable weekly intake for cadmium. *EFSA Journal* **9**.
- EFSA, P. o. D. P. N. A. (2014b). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for chromium. *EFSA Journal* **12**.





- Eichler, A., Gramlich, G., Kellerhals, T., Tobler, L., Schwikowski, M. (2015). Pb pollution from leaded gasoline in South America in the context of a 2000-year metallurgical history. *Environmental Chemistry*, 1-8.
- El Khalil, H., Schwartz, C., El Hamiani, O., Sirguez, C., Kubiniok, J., Boularbah, A. (2016). How physical alteration of technic materials affects mobility and phytoavailability of metals in urban soils? *Chemosphere* **152**, 407-414.
- Elouear, Z., Bouhamed, F., Boujelben, N., Bouzid, J. (2016). Application of sheep manure and potassium fertilizer to contaminated soil and its effect on zinc, cadmium and lead accumulation by alfalfa plants. *Sustainable Environment Research* **26**, 131-135.
- EPA, U. (2007). Non-Carcinogen Tolerable Daily Intake (TDI) Values from US EPA.
- Ericson, B. (2011). Common global pollution issues: Blacksmith Institute's experience. In "Presentation to the 10th Meeting of the International Committee on Contaminated Land," Washington, DC.
- Fabietti, G., Biasioli, M., Barberis, R., Ajmone-Marsan, F. (2010). Soil contamination by organic and inorganic pollutants at the regional scale: the case of Piedmont, Italy. *Journal of Soils and Sediments* **10**, 290-300.
- Fang, Y., Sun, X., Yang, W., Ma, N., Xin, Z., Fu, J., Liu, X., Liu, M., Mariga, A. M., Zhu, X., Hu, Q. (2014). Concentrations and health risks of lead, cadmium, arsenic, and mercury in rice and edible mushrooms in China. *Food Chem* **147**, 147–151.
- FAO/WHO (2006). Joint FAO/WHO Food Standard Programme, codex committee on food additives and contaminants, 38th session. (T. Netherlands, ed.).
- Farooq, M., Anwar, F., Rashid, U. (2008). Appraisal of heavy metal contents in different vegetables grown in the vicinity of an industrial area. *Pak.J.Bot.* **40**, 2099–2106.
- Fenger, J. (2009). Air pollution in the last 50 years - From local to global. . *Atmos Environ.* **43**, 13–22.
- Fernández-Genito, A. P., Duarte, A. C. (2015). Soil management guidelines in Spain and Portugal related to EU Soil Protection Strategy based on analysis of soil databases. *Catena* **126**, 146-154.
- Filippelli, G. M., Laidlaw, M. A. S. (2010). The elephant in the playground: confronting lead-contaminated soils as an important source of lead burdens to urban populations. . *TPerspectives in Biology & Medicine* **53**, 31–45.
- Flora, S., Megha, M., Ashish, M. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research* **128**, 501-523.
- França, F. C. S. S., Albuquerique, A. M. A., Almeida, A. C., Silveira, P. B., Filho, C. A., Hazin, C. A., Honorato, E. V. (2017). Heavy metals deposited in the culture of lettuce (*Lactuca sativa* L.) by the influence of vehicular traffic in Pernambuco, Brazil. *Food Chemistry* **215**, 171-176.
- Frohne, T., Diaz-Bone, R. A., Du Laing, G., Rinklebe, J. (2015). Impact of systematic change of redox potential on the leaching of Ba, Cr, Sr, and V from a riverine soil into water. *J. Soils Sed.* **15**, 623-633.
- Galende, M. A., Becerril, J. M., Barrutia, O., Artetxe, U., Garbisu, C., Hernández, A. (2014). Field assessment of the effectiveness of organic amendments for aided phytostabilization of a Pb–Zn contaminated mine soil. *Journal of Geochemical Exploration* **145** 181–189.
- Gebrekidan, A., Weldegebriel, Y., Hadera, A., Van der Bruggen, B. (2013). Toxicological assessment of heavy metals accumulated in vegetables and fruits grown in Ginfel river



- near Sheba Tannery, Tigray, Northern Ethiopia. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **95**, 171-178.
- Gil-Cardesa, M. L., Ferri, A., Cornejo, P., Gomez, E. (2014). Distribution of chromium species in a Cr-polluted soil: presence of Cr (III) in glomalin related protein fraction. *Sci. Total Environ.* **493**, 828-833.
- Giusti, L. (2011). Heavy metals in urban soils of Bristol (UK). Initial screening for contaminated land. *Journal of Soils and Sediments* **11**, 1385-1398.
- Gonçalves, J. F., Antes, F. G., Maldaner, J., Pereira, L. B., Tabaldi, L. A., Rauber, R., Rossato, L. V., Bisognin, D. A., Dressler, V. L., Flores, E. M., Nicoloso, F. T. (2009). Cadmium and mineral nutrient accumulation in potato plantlets grown under cadmium stress in two different experimental culture conditions. *Plant Physiol Biochem* **47**, 814–821.
- GPP, G. d. P., Políticas e Administração Geral (2015). Informação de mercados - produtos vegetais. (G. d. P. Ministério da Agricultura e do Mar, ed.), pp. 36 p, Portugal.
- Graham, R. D., Knez, M., Welch, R. M. (2012). How much nutritional iron deficiency in humans globally is due to an underlying zinc deficiency? *Advances in Agronomy* **115**, 1–40.
- Guitart, D., Pickering, C., Byrne, J. (2012). Past results and future directions in urban community gardens research. *Urban Forestry & Urban Greening* **11**, 364-373.
- Gundacker, C., Kutalek, R., Glaunach, R., Deweis, C., Hengstschläger, M., Prinz, A. (2017). Geophagy during pregnancy: Is there a health risk for infants? *Environmental Research* **156**, 145-147.
- Guo, G., Zhou, Q., Ma, L. Q. (2006). Availability and assessment of fixing additives for the in situ remediation of heavy metal contaminated soils: a review. *Environ Monit Assess* **116**, 513-28.
- Gupta, D. K., Chatterjee, S., Datta, S., Veer, V., Walther, C. (2014). Role of phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals. *Chemosphere* **108** 134–144.
- Gupta, D. K., Huang, H. G., Corpas, F. J. (2013). Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res Int* **20**, 2150-61.
- Haefliger, P., Mathieu-Nolf, M., Locicero, S., Ndiaye, C., Coly, M., Diouf, A., Faye, A. L., Sow, A., Tempowski, J., Pronczuk, J., Junior, A. P. F., Bertollini, R., Neira, M. (2009). Mass lead intoxication from informal used lead-acid battery recycling in Dakar, Senegal. *Environmental Health Perspectives* **117**, 1535–1540.
- Hammond, G. P., Hazeldine, T. (2015). Indicative energy technology assessment of advanced rechargeable batteries. *Applied Energy* **138**, 559-571.
- Hanna-Attisha, M., LaChance, J., Sadler, R. C., Schnepf, A. C. (2016). Elevated Blood Lead Levels in Children Associated With the Flint Drinking Water Crisis: A Spatial Analysis of Risk and Public Health Response. *AJPH Research* **106**, 283-290.
- Hao, X.-Z., Zhou, D.-M., Li, D.-D., Jiang, P. (2012). Growth, Cadmium and Zinc Accumulation of Ornamental Sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Contaminated Soil with Different Amendments. *Pedosphere* **22**, 631-639.
- Harasim, P., Filipek, T. (2015). Nickel in the environment. *Journal of Elementology* **20**, 525-534.
- Hassan, W., Bano, R., Bashir, S., Aslam, Z. (2016). Cadmium toxicity and soil biological index under potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivation. *Soil Research* **54**, 460-468.
- Hattab, N., Motelica-Heino, M., Faure, O., Bouchardon, J.-L. (2015). Effect of fresh and mature organic amendments on the phytoremediation of technosols contaminated with high concentrations of trace elements. *Journal of Environmental Management* **159**, 37-47.



- Hayat, S., Khalique, G., Irfan, M., Wani, A. S., Tripathi, B. N., Ahmad, A. (2012). Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. *Protoplasma* **249**, 599-611.
- Hmid, A., Al Chami, Z., Sillen, W., De Vocht, A., Vangronsveld, J. (2015). Olive mill waste biochar: a promising soil amendment for metal immobilization in contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 1444-1456.
- Houben, D., Evrard, L., Sonnet, P. (2013). Mobility, bioavailability and pH-dependent leaching of cadmium, zinc and lead in a contaminated soil amended with biochar. *Chemosphere* **92**, 1450-7.
- Hough, R. L., Breward, N., Young, S. D., Crout, N. M., Tye, A. M., Moir, A. M., Thornton, I. (2004a). Assessing potential risk of heavy metal exposure from consumption of home-produced vegetables by urban populations. *Environ Health Perspect* **112**, 215-21.
- Hough, R. L., Breward, N., Young, S. D., Crout, N. M. J., Tye, A. M., Moir, A. M., Thornton, I. (2004b). Assessing potential risk of heavy metal exposure from consumption of home-produced vegetables by urban populations (vol 112, pg 215, 2004). *Environmental Health Perspectives* **112**, 215-221.
- Hseu, Z.-Y., Lai, Y.-J. (2017). Nickel accumulation in paddy rice on serpentine soils containing high geogenic nickel contents in Taiwan. *Environmental Geochemistry and Health*.
- Hsu, L.-C., Liu, Y.-T., Tzou, Y.-M. (2015). Comparison of the spectroscopic speciation and chemical fractionation of chromium in contaminated paddy soils. *J. Hazard. Mater.* **296**, 230-238.
- Hu, J., Wu, F., Wu, S., Sun, X., Lin, X., Wong, M. H. (2013). Phytoavailability and phytovariety codetermine the bioaccumulation risk of heavy metal from soils, focusing on Cd-contaminated vegetable farms around the Pearl River Delta, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **91**, 18-24.
- Imperato, M., Adamo, P., Naimo, D., Arienzo, M., Stanzione, D., Violante, P. (2003). Spatial distribution of heavy metals in urban soils of Naples city (Italy). *Environmental Pollution* **124**, 247-256.
- Intawongse, M., Dean, J. R. (2006). Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract. *Food Addit Contam* **23**, 36-48.
- Irshad, M., Gul, S., Egrinya Eneji, A., Anwar, Z., Ashraf, M. (2014). Extraction of Heavy Metals from Manure and their Bioavailability to Spinach (*Spinacia Oleracea* L.) after Composting. *Journal of Plant Nutrition* **37**, 1661-1675.
- Ishtiaq, S., Mahmood, S. (2011). Phytotoxicity of nickel and its accumulation in tissues of three Vigna species at their early growth stages. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **84**, 223-228.
- Islam, F., Yasmeen, T., Arif, M. S., Riaz, M., Shahzad, S. M., Imran, Q., Ali, I. (2016). Combined ability of chromium (Cr) tolerant plant growth promoting bacteria (PGPB) and salicylic acid (SA) in attenuation of chromium stress in maize plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **108**, 456-467.
- Islam, M. K., Khanam, S., Lee, S. Y., Alam, I., Huhl, M. R. (2014). The interaction of arsenic (As) and chromium (Cr) influences growth and antioxidant status in tossa jute ('*Corchorus olitorius*'). *Plant Omics* **7**, 499.
- Iyaka, Y. A. (2011). Nickel in soils: A review of its distribution and impacts. *Scientific Research and Essays* **6**, 6774-6777.



- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew Blessy, B., Beeregowda Krishnamurthy, N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. In "Interdisciplinary Toxicology", Vol. 7, pp. 60.
- Järup, L., Akesson, A. (2009). Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol* **238**, 201–208.
- Jean-Soro, L., Le Guern, C., Bechet, B., Lebeau, T., Ringeard, M.-F. (2015). Origin of trace elements in an urban garden in Nantes, France. *Journal of Soils and Sediments* **15**, 1802-1812.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2001). "Trace elements in soils and plants," FL.
- Kabata-Pendias, A., Sadurski, W. (2004). Trace elements and compounds in soil. In "Elements and their compounds in the environment, " (eds, ed.), pp. 79–99. Wiley-VCH, Weinheim.
- Kachenko, A. G., Singh, B. (2006). Heavy Metals Contamination in Vegetables Grown in Urban and Metal Smelter Contaminated Sites in Australia. *Water, Air, and Soil Pollution* **169**, 101-123.
- Kanchinadham, S. B. K., Narasimman, L., Pedaballe, V., Kalyanaraman, C. (2015). Diffusion and leachability index studies on stabilization of chromium contaminated soil using fly ash. *J. Hazard. Mater.* **297**.
- Karak, T., Paul, R. K., Sonar, I., Sanyal, S., Ahmed, K. Z., Boruah, R. K., Das, D. K., Dutta, A. K. (2014). Chromium in soil and tea (*Camellia sinensis* L.) infusion: Does soil amendment with municipal solid waste compost make sense? *Food Research International* **64**, 114-124.
- Karthik, C., Oves, M., Thangabalu, R., Sharma, R., Santhosh, S. B., Indra Arulselvi, P. (2016). Cellulosimicrobium funkei-like enhances the growth of *Phaseolus vulgaris* by modulating oxidative damage under Chromium(VI) toxicity. *Journal of Advanced Research* **7**, 839-850.
- Kasprzak, K. S., Sunderman Jr, F. W., Salnikow, K. (2003). Nickel carcinogenesis. Mutation Research. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **533**, 67–97.
- Khan, A., Khan, S., Khan, M. A., Qamar, Z., Waqas, M. (2015). The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 13772–99.
- Khan, K., Lu, Y., Khan, H., Ishtiaq, M., Khan, S., Waqas, M., Wei, L., Wang, T. (2013). Heavy metals in agricultural soils and crops and their health risks in Swat District, northern Pakistan. *Food and Chemical Toxicology* **58**, 449-458.
- Khan, M. A., Khan, S., Khan, A., Alam, M. (2017). Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Science of The Total Environment* **601-602**, 1591-1605.
- Khan, S., Aijun, L., Zhang, S., Hu, Q., Zhu, Y.-G. (2008a). Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in lettuce grown in the soils contaminated with long-term wastewater irrigation. *Journal of Hazardous Materials* **152**, 506-515.
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y. M., Huang, Y. Z., Zhu, Y. G. (2008b). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental Pollution* **152**, 686-692.
- Khan, S., Rehman, S., Zeb Khan, A., Amjad Khan, M., Tahir Shah, M. (2010). Soil and vegetables enrichment with heavy metals from geological sources in Gilgit, northern Pakistan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**, 1820-1827.



- Kim, H. S., Kim, K. R., Ok, Y. S., Lee, Y. K., Kluge, B., Wessolek, G., Kim, W. I., Kim, K.-H. (2015). Examination of Three Different Organic Waste Biochars as Soil Amendment for Metal-Contaminated Agricultural Soils. *Water, Air, & Soil Pollution* **226**, 282.
- Koch, A., McBratney, A., Lal, R. (2012). Put soil security on the global agenda. *Nature* **492**, 186.
- Kopittke, P. M., Asher, C. J., Menzies, N. W. (2008). Prediction of Pb speciation in concentrated and dilute nutrient solutions. *Environ Pollut* **153**, 548-54.
- Kotas, J., Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution* **107**, 263-283.
- Kozlow, M. V. (2005). Pollution resistance of mountain birch, *Betula pubescens* subsp. *czerepanovii*, near the copper-nickel smelter: Natural selection or phenotypic acclimation? *Chemosphere* **59**, 189–197.
- Kukier, U., Peters, C. A., Chaney, R. L., Angle, J. S., Roseberg, R. J. (2004). The effect of pH on metal accumulation in two *Alyssum* species. *J. Environ. Qual.* **33**, 2090–2102.
- Kumar, A., Maiti, S. K. (2013). Availability of chromium, nickel and other associated heavy metals of ultramafic and serpentine soil/rock and in plants. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering* **3**, 256–268.
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C. (2008). Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review. *Waste Management* **28**, 215-225.
- Kushwaha, A., Hans, N., Kumar, S., Rani, R. (2018). A critical review on speciation, mobilization and toxicity of lead in soil/microbe-plant system and bioremediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **147** 1035–1045.
- Lado, L. R., Hengl, T., Reuter, H. I. (2008). Heavy metals in European soils: A geostatistical analysis of the FOREGS Geochemical database. *Geoderma* **148** 189–199.
- Landrot, G., Tappero, R., Webb, S. M., Sparks, D. L. (2012). Arsenic and chromium speciation in an urban contaminated soil. *Chemosphere* **88**, 1196–1201.
- Lar, U. A., Agene, J. I., Umar, A. I. (2015). Geophagic clay materials from Nigeria: a potential source of heavy metals and human health implications in mostly women and children who practice it. *Environmental Geochemistry and Health* **37**, 363–375
- Leake, J. R., Adam-Bradford, A., Rigby, J. E. (2009). Health benefits of 'grow your own' food in urban areas: implications for contaminated land risk assessment and risk management? *Environmental Health* **8**.
- Lee, S. H., Lee, J. S., Jeong Choi, Y., Kim, J. G. (2009). In situ stabilization of cadmium, lead, and zinc contaminated soil using various amendments. *Chemosphere* **77**, 1069–1075.
- Leitão, T., Cameira, M. d. R., Mourato, M., José Henriques, M., Martins, L., Costa, H., Pacheco, J. (2016a). "Evaluation of Soil, Groundwater and Vegetable Quality in Lisbon Urban Allotment Gardens."
- Leitão, T., Henriques, M., Cameira, M., Mourato, M., Rodrigo, I., Martins, L. L., Costa, H., Pacheco, J. (2016b). AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS SOLOS, DAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E DAS ESPÉCIES HORTÍCOLAS EM HORTAS URBANAS DE LISBOA - Identificação de medidas de mitigação visando a proteção da saúde pública. (J. C. Junta de Freguesia de Alvalade, ed.), pp. 134. Laboratório Nacional de Engenharia Civil, I. P., Lisboa •
- Li, L., Wu, H., van Gestel, C. A., Peijnenburg, W. J., Allen, H. E. (2014a). Soil acidification increases metal extractability and bioavailability in old orchard soils of Northeast Jiaodong Peninsula in China. *Environ Pollut* **188**, 144–152.





- Li, N., Kang, Y., Pan, W., Zeng, L., Zhang, Q., Luo, J. (2015a). Concentration and transportation of heavy metals in vegetables and risk assessment of human exposure to bioaccessible heavy metals in soil near a waste-incinerator site, South China. *Science of The Total Environment* **521-522**, 144-151.
- Li, P., Li, C., Cheng, H., Duan, X., Lei, K. (2015b). Contamination and health risks of soil heavy metals around a lead/zinc smelter in southwestern China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **113**, 391-399.
- Li, Z., Ma, Z., van der Kuijp, T. J., Yuan, Z., Huang, L. (2014b). A review of soil heavy metal pollution from mines in China: Pollution and health risk assessment. *Science of The Total Environment* **468-469**, 843-853.
- Liao, Y.-p., Wang, Z.-x., Yang, Z.-h., Chai, L.-y., Chen, J.-q., Yuan, P.-f. (2011). Migration and transfer of chromium in soil-vegetable system and associated health risks in vicinity of ferro-alloy manufactory. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* **21**, 2520-2527.
- Liu, L., Chen, H., Cai, P., Liang, W., Huang, Q. (2009). Immobilization and phytotoxicity of Cd in contaminated soil amended with chicken manure compost. *Journal of Hazardous Materials* **163**, 563-567.
- Liu, X., Lou, C., Xu, L., Sun, L. (2012). Distribution and bioavailability of cadmium in ornithogenic coral-sand sediments of the Xisha archipelago, South China Sea *Environ Pollut* **168**, 151-160.
- Lo, Y. C., Dooyema, C. A., Neri, A., Durant, J., Jefferies, T., Medina-Marino, A., de Ravello, L., Thoroughman, D., Davis, L., Dankoli, R. S., Samson, M. Y., Ibrahim, L. M., Okechukwu, O., Umar-Tsafe, N. T., Dama, A. H., Brown, M. J. (2012). Childhood lead poisoning associated with gold ore processing: a village-level investigation – Zamfara State, Nigeria, October–November 2010. *Environmental Health Perspectives* **120**, 1450-1455.
- Louwagie, G., Gay, S. H., Burrell, A. (2009). Addressing soil degradation in EU agriculture: relevant processes, practices and policies. . EUR 23767 EN.
- Lu, Y., Song, S., Wang, R., Liu, Z., Meng, J., Sweetman, A. J., Jenkins, A., Ferrier, R. C., Li, H., Luo, W., Wang, T. (2015). Impacts of soil and water pollution on food safety and health risks in China. *Environment International* **77**, 5-15.
- Luo, C., Liu, C., Wang, Y., Liu, X., Li, F., Zhang, G., Li, X. (2011). Heavy metal contamination in soils and vegetables near an e-waste processing site, south China. *Journal of Hazardous Materials* **186**, 481-490.
- Luo, K., Ma, T., Liu, H., Wu, L., Ren, J., Nai, F., Li, R., Chen, L., Luo, Y., Christie, P. (2015). Efficiency of Repeated Phytoextraction of Cadmium and Zinc from an Agricultural Soil Contaminated with Sewage Sludge. *International Journal of Phytoremediation* **17**, 575-582.
- Mahar, A., Wang, P., Li, R., Zhang, Z. (2015). Immobilization of Lead and Cadmium in Contaminated Soil Using Amendments: A Review. *Pedosphere* **25**, 555-568.
- Maiti, S., Ghosh, N., Mandal, C., Das, K., Dey, N., Adak, M. K. (2012). Responses of the maize plant to chromium stress with reference to antioxidation activity. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **24**, 203-212.
- Malandrino, M., Abollino, O., Buoso, S., Giacomino, A., La Gioia, C., Mentasti, E. (2011). Accumulation of heavy metals from contaminated soil to plants and evaluation of soil remediation by vermiculite. *Chemosphere* **82**, 169-178.



- Markowitz, M. (2000). Lead poisoning: A disease for the next millennium. *Current Problems in Pediatrics* **30**, 62-70.
- Martin, S., Griswold, W. (2009). Human health effects of heavy metals. *Environmental Science and Technology Briefs for Citizens* **15**, 1–6.
- Martins, L. L., Mourato, M. P., Cardoso, A. I., Pinto, A. P., Mota, A. M., Goncalves, M. d. L. S., de Varennes, A. (2011). Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**, 1375-1383.
- Maxted, A., Black, C., West, H., Crout, N., McGrath, S., Young, S. (2007). Phytoextraction of cadmium and zinc by *Salix* from soil historically amended with sewage sludge. *Plant and Soil* **290**, 157-172.
- McBratney, A., Field, D. J., Koch, A. (2014). The dimensions of soil security. *Geoderma* **213**, 203–213.
- McBride, M. B., Shayler, H. A., Spliethoff, H. M., Mitchell, R. G., Marquez-Bravo, L. G., Ferenz, G. S., Russell-Anelli, J. M., Casey, L., Bachman, S. (2014). Concentrations of lead, cadmium and barium in urban garden-grown vegetables: The impact of soil variables. *Environmental Pollution* **194**, 254-261.
- McBride, M. B., Simon, T., Tam, G., Wharton, S. (2012). Lead and Arsenic Uptake by Leafy Vegetables Grown on Contaminated Soils: Effects of Mineral and Organic Amendments. *Water, Air, & Soil Pollution* **224**, 1378.
- McClintock, N. (2015). A critical physical geography of urban soil contamination. *Geoforum* **65**, 69–85.
- Méndez, A., Paz-Ferreiro, J., Araujo, F., Gascó, G. (2014). Biochar from pyrolysis of deinking paper sludge and its use in the treatment of a nickel polluted soil. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **107**, 46-52.
- Minca, K. K., Basta, N. T., Scheckel, K. G. (2013). Using the Mehlich-3 soil test as an inexpensive screening tool to estimate total and bioaccessible Pb in urban soils. *J. Environ. Qual.* **42**, 1518–1526.
- Mitchell, R. G., Spliethoff, H. M., Ribaud, L. N., Lopp, D. M., Shayler, H. A., Marquez-Bravo, L. G., Lambert, V. T., Ferenz, G. S., Russell-Anelli, J. M., Stone, E. B., McBride, M. B. (2014). Lead (Pb) and other metals in New York City community garden soils: Factors influencing contaminant distributions. *Environmental Pollution* **187**, 162-169.
- Mohan, D., Pittman, C. U. (2006). Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. *J. Hazard. Mater.* **137**, 762-811.
- Mombo, S., Foucault, Y., Deola, F., Gaillard, I., Goix, S., Shahid, M., Schreck, E., Pierart, A., Dumat, C. (2015). Management of human health risk in the context of kitchen gardens polluted by lead and cadmium near a lead recycling company. *J Soils Sediments*.
- Mombo, S., Foucault, Y., Deola, F., Gaillard, I., Goix, S., Shahid, M., Schreck, E., Pierart, A., Dumat, C. (2016). Management of human health risk in the context of kitchen gardens polluted by lead and cadmium near a lead recycling company. *Journal of Soils and Sediments* **16**, 1214-1224.
- Monge, G., Jimenez-Espejo, F. J., Garcia-Alix, A., Martinez-Ruiz, F., Mattielli, N., Finlayson, C., Ohkouchi, N., Sanchez, M. C., de Castro, J. M., Blasco, R., Rosell, J., Carrion, J., Rodriguez-Vidal, J., Finlayson, G. (2015). Earliest evidence of pollution by heavy metals in archaeological sites. *Sci Rep* **5**, 14252.





- Morrison, J. M., Goldhaber, M. B., Lee, L., Holloway, J. M., Wanty, R. B., Wolf, R. E., Ranville, J. F. (2009). A regional-scale study of chromium and nickel in soils of northern California, USA. *Applied Geochemistry* **24**, 1500-1511.
- Mota, D., Marques, P., Rosa, M. F., Gil, L., Marques, C. P. (2006). Lead bioremoval by cork residues as biosorbent. In "ECOWOOD 2006 - 2nd International Conference on Environmentally-Compatible Forest Products", pp. 251-264, Porto, Portugal.
- Mourato, M., Moreira, I., Leitão, I., Pinto, F., Sales, J., Martins, L. (2015). Effect of Heavy Metals in Plants of the Genus Brassica. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 17975.
- Nabulo, G., Black, C. R., Craigon, J., Young, S. D. (2012). Does consumption of leafy vegetables grown in pen-urban agriculture pose a risk to human health? *Environmental Pollution* **162**, 389-398.
- Nabulo, G., Black, C. R., Young, S. D. (2011). Trace metal uptake by tropical vegetables grown on soil amended with urban sewage sludge. *Environmental Pollution* **159**, 368-376.
- Nabulo, G., Young, S. D., Black, C. R. (2010). Assessing risk to human health from tropical leafy vegetables grown on contaminated urban soils. *Science of the Total Environment* **408**, 5338-5351.
- Nagajyoti, P., Lee, K., Sreekanth, T. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* **8**, 199-216.
- NIH, N. I. o. H. (2016). Zinc, Fact Sheet for Health Professionals (U. S. D. o. H. H. Services, ed.).
- Noli, F., Tsamos, P. (2016). Concentration of heavy metals and trace elements in soils, waters and vegetables and assessment of health risk in the vicinity of a lignite-fired power plant. *Sci. Total Environ.* **563**, 377-385.
- Novak, M., Chrastny, V., Cadkova, E., Farkas, J., Bullen, T. D., Tylcer, J., Szurmanova, Z., Cron, M., Prechova, E., Curik, J., Stepanova, M., Pasava, J., Erbanova, L., Houskova, M., Puncchar, K., Hellerich, L. A. (2014). Common Occurrence of a Positive  $\delta^{53}\text{Cr}$  Shift in Central European Waters Contaminated by Geogenic/Industrial Chromium Relative to Source Values. *Environmental Science & Technology* **48**, 6089-6096.
- Oh, Y. J., Song, H., Shin, W. S., Choi, S. J., Kim, Y.-H. (2007). Effect of amorphous silica and silica sand on removal of chromium (VI) by zero-valent iron. *Chemosphere* **66**, 858-865.
- Oliveira, H. (2012). Chromium as an Environmental Pollutant: Insights on Induced Plant Toxicity. *Journal of Botany* **2012**, 8.
- Oliver, M. A., Gregory, P. J. (2015). Soil, food security and human health: a review. *European Journal of Soil Science* **66**, 257-276.
- Ondayo, M. A., Simiyu, G. M., Raburu, P. O., Were, F. H. (2016). Child Exposure to Lead in the Vicinities of Informal Used Lead-Acid Battery Recycling Operations in Nairobi Slums, Kenya. *Journal of Health and Pollution* **6**, 15-25.
- Pan, J., Plant, J. A., Voulvoulis, N., Oates, C. J., Ihlenfeld, C. (2010). Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environmental Geochemistry and Health* **32**, 1-12.
- Panagos, P., Van Liedekerke, M., Yigini, Y., Montanarella, L. (2013). Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network. *Journal of Environmental and Public Health* **2013**, 11.
- Panda, S. K., Choudhury, S. (2005). Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**, 95-102.



- Papadopoulos, A., Prochaska, C., Papadopoulos, F., Gantidis, N., Metaxa, E. (2007). Determination and evaluation of cadmium, copper, nickel, and zinc in agricultural soils of western Macedonia Greece. *Environ. Manage.* **40**, 719–726.
- Papanikolaou, N. C., Hatzidaki, E. G., Belivanis, S., Tzanakakis, G. N., Tsatsakis, A. M. (2005). Lead toxicity update. A brief review. *Med Sci Monitor* **11**, RA329.
- Park, J. H., Choppala, G. K., Bolan, N. S., Chung, J. W., Chuasavathi, T. (2011). Biochar reduces the bioavailability and phytotoxicity of heavy metals. *Plant and Soil* **348**, 439.
- Paul, S., Shakya, K. (2013). Arsenic, chromium and NaCl induced artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L.: A valuable antimalarial plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **98**, 59-65.
- Pavlíková, D., Macek, T., Macková, M., Száková, J., Balík, J. (2004). Cadmium tolerance and accumulation in transgenic tobacco plants with a yeast metallothionein combined with a polyhistidine tail. *International Biodeterioration & Biodegradation* **54**, 233-237.
- Pelfrêne, A., Waterlot, C., Mazzuca, M., Nisse, C., Cuny, D., Richard, A., Denys, S., Heyman, C., Roussel, H., Bidar, G., Douay, F. (2012). Bioaccessibility of trace elements as affected by soil parameters in smelter-contaminated agricultural soils: A statistical modeling approach. *Environmental Pollution* **160**, 130-138.
- Pereira, B. F. F., Rozane, D. E., Araújo, S. R., Barth, G., Queiroz, R. J. B., Nogueira, T. A. R., Moraes, M. F., Cabral, C. P., Boaretto, A. E., Malavolta, E. (2011). Cadmium availability and accumulation by lettuce and rice. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **35**, 645-654.
- Pinto-Correia, T., Ribeiro, N., Sá-Sousa, P. (2010). Introducing the montado, the cork and holm oak agroforestry system of Southern Portugal. *Agroforest Syst* 82-99.
- Pinto, E., Almeida, A. A., Aguiar, A. A., Ferreira, I. M. (2014). Changes in macrominerals, trace elements and pigments content during lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth: influence of soil composition. *Food Chem* **152**, 603-11.
- Pinto, R., Ramos, R. (2008). Avaliação ambiental de hortas urbanas - o caso da cidade de Braga. In "2.º Congresso de Gestão e Conservação da Natureza, Desenvolvimento, Administração e Governança Local.", Tomar, Portugal.
- Pintor, A. M. A., Ferreira, C. I. A., Pereira, J. C., Correia, P., Silva, S. P., Vilar, V. J. P., Botelho, C. M. S., Boaventura, R. A. R. (2012). Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: A review. *Water Research* **46**, 3152-3166.
- Plum, L. M., Rink, L., Haase, H. (2010). The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int J Environ Res Public Health* **7**, 1342-65.
- Poonkothai, M., Vijayavathi, B. S. (2012). Nickel as an essential element and a toxicant. *International Journal of Environmental Sciences* **1**, 285-288.
- Puga, A. P., Abreu, C. A., Melo, L. C. A., Beesley, L. (2015). Biochar application to a contaminated soil reduces the availability and plant uptake of zinc, lead and cadmium. *Journal of Environmental Management* **159**, 86-93.
- Qi, Z.-M., Feng, S.-Y., Helmers, M. J. (2012). Modeling cadmium transport in neutral and alkaline soil columns at various depths. *Pedosphere* **22**, 273–282.
- Qing, X., Zhao, X., Hu, C., Wang, P., Zhang, Y., Zhang, X., Wang, P., Shi, H., Jia, F., Qu, C. (2015). Selenium alleviates chromium toxicity by preventing oxidative stress in cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*) leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **114**, 179-189.



- Quenea, K., Lamy, I., Winterton, P., Bermond, A., Dumat, C. (2009). Interactions between metals and soil organic matter in various particle size fractions of soil contaminated with waste water. *Geoderma* **149**, 217-223.
- Qureshi, A. S., Hussain, M. I., Ismail, S., Khan, Q. M. (2016). Evaluating heavy metal accumulation and potential health risks in vegetables irrigated with treated wastewater. *Chemosphere* **163**, 54-61.
- Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S. N., Mehrotra, S. (2004). Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Science* **167**, 1159-1169.
- Rao, K. S., Mohapatra, M., Anand, S., Venkateswarlu, P. (2010). Review on cadmium removal from aqueous solutions. *Int J Eng Sci Technol* **2**.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* **180**, 169-181.
- Rasmussen, P. E., Levesque, C., Chéniera, M., Gardner, H. D., Jones-Otazo, H., Petrovic, S. (2013). Canadian House Dust Study: Population-based concentrations, loads and loading rates of arsenic, cadmium, chromium, copper, nickel, lead, and zinc inside urban homes. *Science of The Total Environment* **443**, 520-529.
- Rehman, M. Z.-u., Rizwan, M., Ali, S., Fatima, N., Yousaf, B., Naeem, A., Sabir, M., Ahmad, H. R., Ok, Y. S. (2016). Contrasting effects of biochar, compost and farm manure on alleviation of nickel toxicity in maize (*Zea mays* L.) in relation to plant growth, photosynthesis and metal uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **133**, 218-225.
- Reichman, S. M. (2002). "The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc."
- Reis, A. P., Patinha, C., Wragg, J., Dias, A. C., Cave, M., Sousa, A. J., Batista, M. J., Prazeres, C., Costa, C., Ferreira da Silva, E., Rocha, F. (2014). Urban geochemistry of lead in gardens, playgrounds and schoolyards of Lisbon, Portugal: Assessing exposure and risk to human health. *Applied Geochemistry* **44**, 45-53.
- Retamal-Salgado, J., Hirzel, J., Walter, I., Matus, I. (2017). High Cadmium Distribution in Maize (*Zea mays* L.) Straw Could Contaminate the Food Chain in Different Environments. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **14**.
- Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Ibrahim, M., Tsang, D. C. W., Zia-ur-Rehman, M., Zahir, Z. A., Rinklebe, J., Tack, F. M. G., Ok, Y. S. (2017). A critical review on effects, tolerance mechanisms and management of cadmium in vegetables. *Chemosphere*.
- Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Rizvi, H., Rehman, M. Z., Hannan, F., Qayyum, M. F., Hafeez, F., Ok, Y. S. (2016). Cadmium stress in rice: toxic effects, tolerance mechanisms, and management: a critical review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**, 17859–17879.
- Rodrigues, S. M., Cruz, N., Coelho, C., Henriques, B., Carvalho, L., Duarte, A. C., Pereira, E., Römkens, P. F. A. M. (2013). Risk assessment for Cd, Cu, Pb and Zn in urban soils: Chemical availability as the central concept. *Environmental Pollution* **183**, 234-242.
- Rodríguez-Seijo, A., Alfaya, M. C., Andrade, M. L., Vega, F. A. (2016). Copper, Chromium, Nickel, Lead and Zinc Levels and Pollution Degree in Firing Range Soils. *Land Degradation & Development* **27**, 1721–1730.
- Romic, M., Romic, D. (2003). Heavy metals distribution in agricultural topsoils in urban area. *Environmental Geology* **43**, 795-805.
- Rossato, L., MacFarlane, J., Whittaker, M., Pudmenzky, A., Doley, D., Schmidt, S., Monteiro, M. J. (2011). Metal-binding particles alleviate lead and zinc toxicity during seed



- germination of metallophyte grass *Astrebula lappacea*. *Journal of Hazardous Materials* **190** 772–779.
- Roy, M., McDonald, L. M. (2015). Metal Uptake in Plants and Health Risk Assessments in Metal-Contaminated Smelter Soils. *Land Degradation & Development* **26**, 785-792.
- Sagardoy, R., Morales, F., López-Millán, A. F., Abadía, A., Abadía, J. (2009). Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biology* **11** 339–350.
- Saha, N., Zaman, M. R. (2013). Evaluation of possible health risks of heavy metals by consumption of foodstuffs available in the central market of Rajshahi City, Bangladesh. *Environ Monit Assess* (*)* : **185**, 3867–3878
- Sammut, M., Noack, Y., Rose, J., Hazemann, J., Proux, O., Depoux Ziebel, M., Fiani, E. (2010). Speciation of Cd and Pb in dust emitted from sinter plant. *Chemosphere* **78**, 445–450.
- Sampaio, R. A., Silva, L. G., Costa, A. C., Fernandes, L. A., Guilherme, D. O. (2009). Caracterização qualitativa e quantitativa de metais pesados em alface adubada com composto de lixo urbano. *R. Bras. Eng. Agric. Amb.* **13**, 948-954.
- Santos, C., Rodriguez, E. (2012). Review on Some Emerging Endpoints of Chromium (VI) and Lead Phytotoxicity. In "Botany" (J. Mworio, ed.), pp. 61-82. InTech.
- Sato, A., Takeda, H., Oyanagi, W., Nishihara, E., Murakami, M. (2010). Reduction of cadmium uptake in spinach (*Spinacia oleracea* L.) by soil amendment with animal waste compost. *Journal of Hazardous Materials* **181**, 298-304.
- Säumel, I., Kotsyuk, I., Hölscher, M., Lenkerei, C., Weber, F., Kowarik, I. (2012). How healthy is urban horticulture in high traffic areas? Trace metal concentrations in vegetable crops from plantings within inner city neighbourhoods in Berlin, Germany. *Environmental Pollution* **165**, 124-132.
- Sauvé, S., Hendershot, W., Allen, H. (2000). Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter. *Environ Sci Technol* **34**, 1125–1131.
- Schlecht, M. T., Säumel, I. (2015). Wild growing mushrooms for the Edible City? Cadmium and lead content in edible mushrooms harvested within the urban agglomeration of Berlin, Germany. *Environmental Pollution* **204**, 298-305.
- Schwartz, G. G., Reis, I. M. (2000). Is cadmium a cause of human pancreatic cancer? . *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**, 139-145.
- Seregin, I. V., Kozhevnikova, A. D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **53**, 257-277.
- Shadreck, I. (2013). Chromium, an essential nutrient and pollutant: a review. . *Afr. J. Pure Appl. Chem.* **7**, 310-317.
- Shaheen, S. M., Antoniadis, V., Kwon, E. E., Biswas, J. K., Wang, H., Ok, Y. S., Rinklebe, J. (2017). Biosolids application affects the competitive sorption and lability of cadmium, copper, nickel, lead, and zinc in fluvial and calcareous soils. *Environmental Geochemistry and Health*, 1–15
- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Niazi, N. K., Antunes, P. M. C. (2016a). Cadmium Bioavailability, Uptake, Toxicity and Detoxification in Soil-Plant System. In "Reviews of Environmental Contamination and Toxicology" (P. d. Voogt, ed.), Vol. 241, pp. 74-115. Springer International Publishing Switzerland.



- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Schreck, E., Xiong, T., Niazi, N. K. (2016b). Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: a comparison of foliar and root metal uptake. *J. Hazard. Mater.* **325**, 36-58.
- Shahid, M., Shamshad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niazi, N., Dumat, C., Rashid, M. (2017a). Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere* **178** 513-533.
- Shahid, M., Shamshad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niazi, N. K., Dumat, C., Rashid, M. I. (2017b). Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere* **178**, 513-533.
- Shahid, M., Xiong, T., Castrec-Rouelle, M., Leveque, T., Dumat, C. (2013). Water extraction kinetics of metals, arsenic and dissolved organic carbon from industrial contaminated poplar leaves. *J Environ Sci Technol* **25**, 2451–2459.
- Shan, H., Su, S., Liu, R., Li, S. (2016). Cadmium availability and uptake by radish (*Raphanus sativus*) grown in soils applied with wheat straw or composted pig manure. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**, 15208–15217.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International* **31**, 739-753.
- Shen, Z., Som, A. M., Wang, F., Jin, F., McMillan, O., Al-Tabbaa, A. (2016). Long-term impact of biochar on the immobilisation of nickel (II) and zinc (II) and the revegetation of a contaminated site. *Science of The Total Environment* **542**, 771-776.
- Sikka, R., Nayyar, V. (2012). Cadmium Accumulation and Its Effects on Uptake of Micronutrients in Indian Mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern.] Grown in a Loamy Sand Soil Artificially Contaminated with Cadmium. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **43**, 672-688.
- Silva, H. F. F. A. d. (2015). Avaliação integrada da poluição por metais tóxicos na cidade de Lisboa, Faculty of Sciences, University of Lisbon, Lisbon.
- Singh, A., Sharma, R. K., Agrawal, M., Marshall, F. M. (2010a). Health risk assessment of heavy metals via dietary intake of foodstuffs from the wastewater irrigated site of a dry tropical area of India. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 611-619.
- Singh, A., Sharma, R. K., Agrawal, M., Marshall, F. M. (2010b). Health risk assessment of heavy metals via dietary intake of foodstuffs from the wastewater irrigated site of a dry tropical area of India. *Food Chem Toxicol* **48**, 611–619.
- Singh, G., Brar, M. S., Malhi, S. S. (2007). Decontamination of Chromium by Farm Yard Manure Application in Spinach Grown in Two Texturally Different Cr-Contaminated Soils. *Journal of Plant Nutrition* **30**, 289-308.
- Singh, H., Mahajan, P., Kaur, S., Batish, D., Kohli, R. (2013). Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environmental Chemistry Letters* **11**, 229-254.
- Sipter, E., Rozsa, E., Gruiz, K., Tatrai, E., Morvai, V. (2008). Site-specific risk assessment in contaminated vegetable gardens. *Chemosphere* **71**, 1301-7.
- Sreekanth, T. V. M., Nagajyothi, P. C., Lee, K. D., Prasad, T. N. V. K. V. (2013). Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology* **10**, 1129-1140.
- Stanislawski-Glubiak, E., Korzeniowska, J. (2005). Criteria for assessing the toxicity of zinc to plants. *IUNGPB* **107**, 12.
- Steffan, J. J., Brevika, E. C., Burgess, L. C., Cerdà, A. (2017). The effect of soil on human health: an overview *European Journal of Soil Science* 1-13.





- Stewart, L. R., Farver, J. R., Gorsevski, P. V., Miner, J. G. (2014). Spatial prediction of blood lead levels in children in Toledo, OH using fuzzy sets and the site-specific IEUBK model. *Appl. Geochem.* **45**, 120–129.
- Szolnoki, Z., Farsang, A. (2013). Evaluation of Metal Mobility and Bioaccessibility in Soils of Urban Vegetable Gardens Using Sequential Extraction. *Water Air and Soil Pollution* **224**.
- Szolnoki, Z., Farsang, A., Puskás, I. (2013). Cumulative impacts of human activities on urban garden soils: Origin and accumulation of metals. *Environmental Pollution* **177**, 106–115.
- Taghipour, M., Jalali, M. (2016). Influence of organic acids on kinetic release of chromium in soil contaminated with leather factory waste in the presence of some adsorbents. *Chemosphere* **155**, 395–404.
- Tang, X., Li, X., Liu, X., Hashmi, M. Z., Xu, J., Brookes, P. C. (2015). Effects of inorganic and organic amendments on the uptake of lead and trace elements by *Brassica chinensis* grown in an acidic red soil. *Chemosphere* **119** 177–183.
- Tavarez, M., Macri, A., Sankaran, R. P. (2015). Cadmium and zinc partitioning and accumulation during grain filling in two near isogenic lines of durum wheat. *Plant Physiol Biochem* **97**, 461–469.
- Taylor, M. P., Winder, C., Lanphear, B. P. (2012). Eliminating childhood lead toxicity in Australia: a call to lower the intervention level. *MJA* **197**, 493.
- Tian, H. Z., Lu, L., Cheng, K., Hao, J. M., Zhao, D., Wang, Y. S., Jia, W. X., Qiua, P. P. (2012). Anthropogenic atmospheric nickel emissions and its distribution characteristics in China. *Science of the Total Environment* **1417-418**, 148–157.
- Tóth, G., Hermann, T., Szatmári, G., Pásztor, L. (2016). Maps of heavy metals in the soils of the European Union and proposed priority areas for detailed assessment. *Science of the Total Environment* **565** 1054–1062.
- Tripathi, D. K., Singh, V. P., Prasad, S. M., Chauhan, D. K., Dubey, N. K. (2015). Silicon nanoparticles (SiNp) alleviate chromium (VI) phytotoxicity in *Pisum sativum* (L.) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* **96**, 189–198.
- Trujillo-González, J. M., Torres-Mora, M. A., Keesstra, S., Brevik, E. C., Ballesta, R. J. (2016). Heavy metal accumulation related to population density in road dust samples taken from urban sites under different land uses. *Science of the Total Environment* **553**, 636–642.
- Trumbo, P., Yates, A. A., Schlicker, S., Poos, M. (2001). Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J. Am. Diet. Assoc.* **101**, 294–301.
- Tume, T., González, E., King, R. W., Cuitiño, L., Roca, N., Bech, J. (2017). Distinguishing between natural and anthropogenic sources for potentially toxic elements in urban soils of Talcahuano, Chile. *J Soils Sediments* **2017**.
- Turner, A. H. (2009). Urban Agriculture and Soil Contamination: An Introduction to Urban Gardening (E. F. Center, ed.). EPA, Louisville.
- UdDin, I., Bano, A., Masood, S. (2015). Chromium toxicity tolerance of *Solanum nigrum* L. and *Parthenium hysterophorus* L. plants with reference to ion pattern, antioxidation activity and root exudation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **113**, 271–278.
- UNEP (2010). Final review of scientific information on cadmium. pp. December:1–118.
- United States Environmental Protection Agency, E. (2017). Lead.



- Usman, A. R. A., Almaroai, Y. A., Ahmad, M., Vithanage, M., Ok, Y. S. (2013). Toxicity of Synthetic Chelators and Metal Availability in Poultry Manure Amended Cd, Pb and As Contaminated Agricultural Soil. *Journal of Hazardous Materials*, 1-38.
- Uzu, G., Sobanska, S., Aliouane, Y., Pradere, P., Dumat, C. (2009). Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic particles in relation with lead speciation. *Environ. Pollut.* **157**, 1178–1185.
- van den Berg, A. E., van Winsum-Westra, M., de Vries, S., van Dillen, S. M. (2010). Allotment gardening and health: a comparative survey among allotment gardeners and their neighbors without an allotment. *Environ Health* **9**, 74.
- van der Ent, A., Erskine, P., Sumail, S. (2015). Ecology of nickel hyperaccumulator plants from ultramafic soils in Sabah (Malaysia). *Chemoecology* **25**:243.
- Varalakshmi, L. R., Ganeshamurthy, A. N. (2013). Phytotoxicity of Cadmium in Radish and Its Effects on Growth, Yield, and Cadmium Uptake. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **44**, 1444-1456.
- Varennes, A. (2003). "Produtividade dos Solos e Ambiente," Escolar Editora.
- Villalobos-Aragón, A., Ellis, A. S., Armienta, M. A., Morton-Bermea, O., Johnson, T. M. (2012). Geochemistry and Cr stable isotopes of Cr-contaminated groundwater in León valley, Guanajuato, México. *Applied Geochemistry* **27**, 1783-1794.
- von Lindern, I., Spalinger, S., Stifelman, M. L., Stanek, L. W., Bartrem, C. (2016). Estimating children's soil/dust ingestion rates through retrospective analyses of blood lead biomonitoring from the Bunker Hill Superfund Site in Idaho. *Environmental Health Perspectives* **124**, 1462–1470.
- Walraven, N., van Os, B. J. H., Klaver, G. T., Middelburg, J. J., Davies, G. R. (2014). The lead (Pb) isotope signature, behaviour and fate of traffic-related lead pollution in roadside soils in The Netherlands. *Science of the Total Environment* **472** 888–900.
- Wang, Y., Qiao, M., Liu, Y., Zhu, Y. (2012). Health risk assessment of heavy metals in soils and vegetables from wastewater irrigated area, Beijing-Tianjin city cluster, China. *Journal of Environmental Sciences* **24**, 690-698.
- Wang, Z.-x., Chen, J.-q., Chai, L.-y., Yang, Z.-h., Huang, S.-h., Zheng, Y. (2011a). Environmental impact and site-specific human health risks of chromium in the vicinity of a ferro-alloy manufactory, China. *J. Hazard. Mater.* **190**, 980-985.
- Wang, Z.-x., Chen, J.-q., Chai, L.-y., Yang, Z.-h., Huang, S.-h., Zheng, Y. (2011b). Environmental impact and site-specific human health risks of chromium in the vicinity of a ferro-alloy manufactory, China. *Journal of Hazardous Materials* **190**, 980-985.
- Warming, M., Hansen, M. G., Holm, P. E., Magid, J., Hansen, T. H., Trapp, S. (2015). Does intake of trace elements through urban gardening in Copenhagen pose a risk to human health? *Environmental Pollution* **202**, 17-23.
- Waterlot, C., Bidar, G., Pelfrêne, A., Roussel, H., Fourrier, H., Douay, F. (2013). Contamination, Fractionation and Availability of Metals in Urban Soils in the Vicinity of Former Lead and Zinc Smelters, France. *Pedosphere* **23**, 143-159.
- Werkenthin, M., Kluge, B., Wessolek, G. (2014). Metals in European roadside soils and soil solution – A review. *Environmental Pollution* **189**, 98-110.
- WHO (2003). GEMS/Food regional diets: regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities., Geneva.
- Woldetsadik, D., Drechsel, P., Keraita, B., Marschner, B., Itanna, F., Gebrekidan, H. (2016). Effects of biochar and alkaline amendments on cadmium immobilization, selected





- nutrient and cadmium concentrations of lettuce (*Lactuca sativa*) in two contrasting soils. *SpringerPlus* **5**, 397.
- Wolf, M., Baretta, D., Becegato, V. A., Almeida, V. d. C., Paulino, A. T. (2017). Copper/Zinc Bioaccumulation and the Effect of Phytotoxicity on the Growth of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Non-contaminated, Metal-Contaminated and Swine Manure-Enriched Soils. *Water, Air, & Soil Pollution* **228**, 152.
- Wolfe, P. J., Giang, A., Ashok, A., Selin, N. E., Barrett, S. R. H. (2016). Costs of IQ Loss from Leaded Aviation Gasoline Emissions. *Environ. Sci. Technol.*
- Wu, L., Tan, C., Liu, L., Zhu, P., Peng, C., Luo, Y., Christie, P. (2012). Cadmium bioavailability in surface soils receiving long-term applications of inorganic fertilizers and pig manure. *Geoderma* **173**, 224-230.
- Wu, S., Peng, S., Zhang, X., Wu, D., Luo, W., Zhang, T., Zhou, S., Yang, G., Wan, H., Wu, L. (2015). Levels and health risk assessments of heavy metals in urban soils in Dongguan, China. *Journal of Geochemical Exploration* **148**, 71–78.
- Wuana, R. A., Okieimen, F. E. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology* **2011**, 20.
- Xiao, W., Ye, X., Yang, X., Li, T., Zhao, S., Zhang, Q. (2015). Effects of alternating wetting and drying versus continuous flooding on chromium fate in paddy soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **113**, 439-445.
- Xiong, T., Dumat, C., Pierart, A., Shahid, M., Kang, Y., Li, N., Bertoni, G., Laplanche, C. (2016). Measurement of metal bioaccessibility in vegetables to improve human exposure assessments: field study of soil-plant-atmosphere transfers in urban areas - South China *Environ. geochem. Health*, 1-19.
- Xu, D., Zhou, P., Zhan, J., Gao, Y., Dou, C., Sun, Q. (2013). Assessment of trace metal bioavailability in garden soils and health risks via consumption of vegetables in the vicinity of Tongling mining area, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **90**, 103-111.
- Yadav, S. K., Dhote, M., Kumar, P., Sharma, J., Chakrabarti, T., Juwarkar, A. A. (2010). Differential antioxidative enzyme responses of *Jatropha curcas* L. to chromium stress. *Journal of Hazardous Materials* **180**, 609-615.
- Yeganeh, M., Afyuni, M., Khoshgoftarmanesh, A.-H., Khodakarami, L., Amini, M., Soffyanian, A.-R., Schulin, R. (2013a). Mapping of human health risks arising from soil nickel and mercury contamination. *Journal of Hazardous Materials* **244-245**, 225-239.
- Yeganeh, M., Afyuni, M., Khoshgoftarmanesh, A.-H., Khodakarami, L., Amini, M., Soffyanian, A.-R., Schulin, R. (2013b). Mapping of human health risks arising from soil nickel and mercury contamination. *Journal of Hazardous Materials* **244-245**, 225-239.
- Yin, D., Wang, X., Chen, C., Peng, B., Tan, C., Li, H. (2016). Varying effect of biochar on Cd, Pb and As mobility in a multi-metal contaminated paddy soil. *Chemosphere* **152**, 196-206.
- Younis, U., Malik, S. A., Rizwan, M., Qayyum, M. F., Ok, Y. S., Shah, M. H. R., Rehman, R. A., Ahmad, N. (2016). Biochar enhances the cadmium tolerance in spinach (*Spinacia oleracea*) through modification of Cd uptake and physiological and biochemical attributes. *Environmental Science and Pollution Research* **23**, 21385-21394.
- Younis, U., Qayyum, M. F., Shah, M. H. R., Danish, S., Shahzad, A. N., Malik, S. A., Mahmood, S. (2015). Growth, survival, and heavy metal (Cd and Ni) uptake of spinach (*Spinacia*



- oleracea) and fenugreek (*Trigonella corniculata*) in a biochar-amended sewage-irrigated contaminated soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **178**, 209-217.
- Yousaf, B., Liu, G., Wang, R., Imtiaz, M., Zia-ur-Rehman, M., Munir, M. A. M., Niu, Z. (2016). Bioavailability evaluation, uptake of heavy metals and potential health risks via dietary exposure in urban-industrial areas. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**, 22443-22453.
- Yu, C. H., Huang, L., Shin, J. Y., Artigas, F., Fan, Z. (2014). Characterization of concentration, particle size distribution, and contributing factors to ambient hexavalent chromium in an area with multiple emission sources. *Atmospheric Environment* **94** 701-708.
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Ahmad, A. (2012). 24-Epibrassinolide modulates growth, nodulation, antioxidant system, and osmolyte in tolerant and sensitive varieties of *Vigna radiata* under different levels of nickel: A shotgun approach. *Plant Physiology* **57**, 143-153.
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Hayat, S., Ahmad, A. (2011). Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **86**, 1-17.
- Zaimoglu, Z., Koksall, N., Basci, N., Kesici, M., Gulen, H., Budak, F. (2011). Antioxidative enzyme activities in *Brassica juncea* L. and *Brassica oleracea* L. plants under chromium stress. *Journal of Food Agriculture & Environment* **9**, 676-679.
- Zarcinas, B. A., Ishak, C. F., McLaughlin, M. J., Cozens, G. (2004). Heavy metals in soils and crops in Southeast Asia. 1-Peninsular Malaysia. *Environ. Geochem. Health* **26**, 343–357.
- Zartarian, V., Xue, J., Tornero-Velez, R., Brown, J. (2017). Children's Lead Exposure: A Multimedia Modeling Analysis to Guide Public Health Decision-Making. *Environmental Health Perspectives*, 1-10.
- Zayed, A. M., Terry, N. (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and Soil* **249**, 139-156.
- Zeng, F., Ali, S., Zhang, H., Ouyang, Y., Qiu, B., Wu, F., Zhang, G. (2011). The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. *Environ. Pollut.* **159**, 84-91.
- Zhang, K., Yuan, J., Kong, W., Yang, Z. (2013). Genotype variations in cadmium and lead accumulations of leafy lettuce (*Lactuca sativa* L.) and screening for pollution-safe cultivars for food safety. *Environ. Sci. Process. Impacts* **15**, 1245–55.
- Zhang, S., Song, J., Cheng, Y., Christie, P., Longd, J., Liu, L. (2018). Derivation of reliable empirical models describing lead transfer from metal-polluted soils to radish (*Raphanus sativa* L.): Determining factors and soil criteria. *Science of the Total Environment* **613–614** 72–80.
- Zhang, W.-L., Du, Y., Zhai, M.-M., Shang, Q. (2014a). Cadmium exposure and its health effects: a 19-year follow-up study of a polluted area in China *Sci Total Environ* **470-471**, 224–228.
- Zhang, Z.-y., Meng, J., Dang, S., Chen, W.-f. (2014b). Effect of Biochar on Relieving Cadmium Stress and Reducing Accumulation in Super japonica Rice. *Journal of Integrative Agriculture* **13**, 547-553.
- Zhao, F.-J., Ma, Y., Zhu, Y.-G., Tang, Z., McGrath, S. P. (2015). Soil contamination in China: current status and mitigation strategies. *Environ Sci Technol* **49**.
- Zhou, Y.-F., Haynes, R. J. (2010). Sorption of Heavy Metals by Inorganic and Organic Components of Solid Wastes: Significance to Use of Wastes as Low-Cost Adsorbents and Immobilizing Agents. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **40**, 909-977.



Zhu, W., Du, W., Shen, X., Zhang, H., Ding, Y. (2017). Comparative adsorption of  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  by cow manure and its vermicompost. *Environmental Pollution* **227** 89-97.





# Capítulo VII

## Conclusões finais



## Índice

Índice .....	681
Capítulo VII - Conclusões Finais.....	683
Anexos.....	693





## Capítulo VII - Conclusões Finais

Os efeitos da acumulação de EPTs são dependentes de diferentes condições designadamente, da própria planta, idade, da toxicidade do EPT, das quantidades acumuladas, do local onde se acumulam na planta, bem como da qualidade da resposta metabólica global que a planta é capaz de desenvolver em cada situação.

Como consequência da acumulação de EPTs as plantas desenvolvem mecanismos bioquímicos de resposta antioxidante concertada, que constituem uma forma de tolerância e/ou defesa contra os efeitos tóxicos que estes causam. Dada a enorme complexidade destes mecanismos, é absolutamente fundamental a sua identificação e caracterização, de forma a obter os indicadores de fitotoxicidade mais adequados para cada cenário, bem como a ponderação da possibilidade de utilização de medidas corretivas em situações reais de solos contaminados.

- Tanto na **germinação** como nas **fases iniciais do desenvolvimento**, verificou-se que ambas as cultivares de alface estudadas se comportaram de forma bastante semelhante, e apenas pontualmente se verificaram pequenas diferenças. Com todos os EPTs, a germinação não é afetada, mesmo em concentrações relativamente altas. Conclui-se que a TG está relacionada principalmente com a permeabilidade do revestimento da semente e não com a embebição, e que depende diretamente da cultivar de planta.
- No que se refere ao **desenvolvimento de plântulas** é possível verificar o aparecimento de sintomas visíveis de toxicidade, e efeitos negativos no seu crescimento, tanto da parte aérea e da raiz, principalmente para as concentrações mais elevadas. O Cd e o Cu são os elementos que induzem efeitos tóxicos visíveis mais precoces enquanto que o Mn é o elemento que manifesta um menor efeito tóxico. O efeito tóxico de todos os EPTs é mais evidente nas raízes que na parte aérea. Na parte aérea das plântulas de ambas as cultivares há uma acumulação de quantidades significativas de todos os EPTs estudados. A quantidade de EPT acumulada diferiu para cada elemento, verificando-se que há maior acumulação de Cd e Mn. Apesar da elevada acumulação de Mn, as plântulas aparentemente demonstraram ser mais tolerantes e apenas manifestaram efeitos de toxicidade a partir de 2000 µM.
- A **acumulação** difere com o tipo de EPT, o órgão da planta e a cultivar. A alface M4E acumulou uma quantidade superior de EPTs relativamente à cultivar DP,

mas há diferenças nos comportamentos de acumulação para cada um dos EPTs estudados.

Não existiram grandes diferenças entre as duas cultivares, na parte aérea e na raiz, em relação aos teores acumulados de Cd, Cr e Cu (neste último caso, apenas para as raízes). Verifica-se que a alface DP acumula mais Pb, tanto na parte aérea como nas raízes, e mais Cu na parte aérea. A alface M4E acumula mais Ni e Zn em ambas as partes da planta.

Contudo, a acumulação dos elementos é descrita por diferentes modelos o que sugere a existência de mecanismos diferenciados tanto em função do tipo de metal, como da cultivar e da parte da planta, raiz e parte aérea. Assim, verifica-se que:

(i) o modelo hiperbólico aplica-se:

- Cd (parte aérea e raízes de ambas as cultivares)
- Pb (raízes de ambas as cultivares)
- Ni (parte aérea e raízes de ambas as cultivares)
- Zn (raízes da cultivar DP)

(ii) o modelo polinomial ajusta-se:

- Cr (parte aérea e raízes de ambas as cultivares)
- Zn (raízes da cultivar M4E)

(iii) o modelo linear descreve a acumulação de:

- Cu (raízes e parte aérea de ambas as cultivares)
- Pb (parte aérea de ambas as cultivares)
- Zn (parte aérea de ambas as cultivares).

O modelo hiperbólico indica uma tendência para estabilização dos teores de metal absorvidos, compatível com uma planta acumuladora; no modelo polinomial há uma acumulação inicial lenta mas crescente com a concentração de metal no meio (compatível com um comportamento de planta exclusora do

metal). O modelo linear comprova uma proporcionalidade direta entre os valores de metal absorvidos e os presentes no meio de crescimento.

Todos os metais provocaram uma redução significativa da biomassa das plantas de alface, mais acentuada para as concentrações mais elevadas, sendo esse efeito menos notório para o Pb e mais evidente para o Cr e para o Ni. Tanto o Cu como o Cr e o Pb são pouco translocados para a parte aérea.

- A tolerância ao stresse causado pelos EPTs envolve alterações bioquímicas específicas que resulta de mecanismos intracelulares de resposta antioxidante, de natureza integrativa, enzimática e não-enzimática. A **avaliação da resposta antioxidante** foi avaliada para a cultivar **M4E** exposta a condições de stresse induzido por elementos não-essenciais (cádmio, crómio e chumbo) e essenciais (níquel e zinco), com cultura sem solo. Na **planta jovem** verificou-se maior tolerância à presença de EPTs, com menores danos oxidativos e mais eficiente no controlo dos níveis de  $H_2O_2$ . Na **planta adulta**, os elementos que apresentam maior efeito tóxico em folhas são os que evidenciaram maior translocação para a parte aérea, tal como o Cd, Ni, Zn. As folhas apresentam maior sensibilidade à presença de EPTs apesar de ser na raiz que se verifica uma maior acumulação de cada elemento. As folhas velhas evidenciam uma intensidade de stresse superior para a maior parte dos metais estudados. As principais conclusões foram as seguintes:

**Cádmio:** Em ambos os estados de desenvolvimento a presença de diferentes níveis de Cd permite ativar diferentes mecanismos de resposta, e a capacidade de resposta da planta difere consoante a intensidade do stresse. Na **planta jovem** o ASA é o principal responsável por controlar os níveis de  $H_2O_2$  e por não se manifestarem danos oxidativos nas folhas. Para além da ação do ASA no controlo do stresse oxidativo estão também ativos outros mecanismos envolvendo a ação da PAL e de compostos fenólicos.

Na **planta adulta** há uma resposta mais intensa, com o sistema antioxidante enzimático a atuar de forma concertada com o sistema não-enzimático, envolvendo o ASA e o GSH. Tanto em folhas novas como velhas, há efeitos evidentes resultantes de stresse oxidativo, aumento de  $H_2O_2$ , MDA, e danos nos pigmentos (clorofila). Contudo, a resposta ao stresse é muito eficiente, com ativação de enzimas antioxidantes (CAT, APX, POD), aumento de GSH (e ASA nas folhas velhas) bem como outras respostas do metabolismo secundário (PAL,

compostos fenólicos) que permitem controlar os níveis de ROS em excesso. Visualmente é possível verificar a síntese de antocianinas. Na raiz não se verificam danos oxidativos, demonstrando que os mecanismos ativos são eficientes na remoção do  $H_2O_2$ , suportados principalmente pela ação da CAT e pelo ASA.

**Crômio:** diferentes concentrações de Cr ativam diferentes mecanismos de resposta, dependendo do estado de desenvolvimento da planta. O stresse oxidativo causado pelo Cr é maior nas raízes que nas folhas, em que os níveis acumulados são mais baixos, e os mecanismos de defesa são eficientes no controlo do stresse oxidativo, uma vez que não se verifica aumento dos teores de MDA e  $H_2O_2$ . Na **planta jovem**, 2 dias são suficientes para induzir uma resposta ligeiramente mais pronunciada que na planta adulta; com 5  $\mu M$  já ocorre síntese de compostos fenólicos e produção de GSH; com 15  $\mu M$  ocorre síntese de antocianinas, aumento da atividade da POD, GR e produção de GSH. Na **planta adulta**, não se observam diferenças significativas nos indicadores de stresse oxidativo (MDA e  $H_2O_2$ ), e a resposta antioxidante envolve o ASA e compostos fenólicos, e também GR e antocianinas, para as concentrações mais elevadas de crômio. Nas folhas velhas, os mecanismos ativos (compostos fenólicos, CAT, POD, APX, ASA) parecem ser eficientes. Nas raízes, concentrações mais elevadas de Cr levam ao aumento dos níveis de  $H_2O_2$  mas sem ocorrência de peroxidação lipídica, apesar do aumento na atividade da CAT e POD.

**Chumbo:** A raiz é o órgão mais afetado pela presença deste elemento e há uma capacidade de resposta mais eficiente em folhas. Nas folhas da **planta jovem**, não se observa o aumento dos níveis de  $H_2O_2$  nem ocorrem danos oxidativos; para as concentrações mais baixas há uma resposta eficiente assegurada pela POD e GSH, e em concentrações mais altas envolve também a CAT, a PAL e a síntese de antocianinas. Na raiz há um controlo eficiente dos níveis de  $H_2O_2$ , pelo que não ocorrem danos oxidativos. Os mecanismos de resposta responsáveis por este controlo são maioritariamente enzimáticos (CAT, POD). Nas folhas jovens da **planta adulta** há também controlo dos níveis de  $H_2O_2$  e não ocorre peroxidação lipídica. Para as concentrações de chumbo menores há a resposta concertada entre mecanismos enzimáticos (CAT) e não-enzimáticos (ASA, GSH), enquanto que para concentrações mais elevadas se verifica o aumento da atividade enzimática da CAT e GPX. Na raiz da planta adulta, a

resposta antioxidante parece ocorrer apenas em excesso de Pb. Apesar do aumento da CAT, há aumento dos níveis de  $H_2O_2$ , e não são evitados danos oxidativos.

**Níquel:** Nas plantas de alface, tanto a folha como a raiz, são afetadas pela presença de níquel. Nas **plantas jovens** há uma resposta antioxidante tanto em folhas como na raiz, com ativação de mecanismos que envolvem a PAL, compostos fenólicos, antocianinas, e também a produção de GSH (para concentrações superiores), o que permite controlar os níveis de  $H_2O_2$  e evitar danos oxidativos. Na raiz não se observa peroxidação lipídica apesar dos elevados níveis de  $H_2O_2$  existentes. Na **planta adulta** a quantidade de Ni acumulada é bastante superior à da planta jovem, causando stresse oxidativo mais intenso e, conseqüentemente, uma resposta mais intensa na planta. A presença de níquel em folhas e raízes desencadeia mecanismos de resposta enzimática e não-enzimática que, nestas condições experimentais, não foram eficientes em controlar os níveis de stresse. Em folhas novas verificou-se aumento de  $H_2O_2$  e aparecimento de danos oxidativos, e em folhas velhas, a intensidade do stresse foi ainda superior. A resposta antioxidante assenta nos diversos mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos referidos, síntese de compostos fenólicos, a ativação de mecanismos enzimáticos (CAT, POD, SOD, GR) bem como a produção de ASA e GSH. Na raiz, a exposição a 50  $\mu M$  não provoca o aumento nos níveis de peróxido de hidrogénio provavelmente devido à atividade da POD. A exposição a 125  $\mu M$  provoca danos oxidativos com o aumento dos níveis de  $H_2O_2$  apesar do aumento da atividade enzimática da CAT, POD e APX.

**Zinco:** a resposta na planta adulta é mais intensa que na planta jovem pois é nas plantas adultas que o stresse é mais intenso. A resposta nas **plantas jovens** revelou-se mais eficiente no controlo dos teores de  $H_2O_2$  evitando o aparecimento de peroxidação lipídica na maior parte dos casos. Nas folhas, com baixos níveis de Zn os mecanismos de defesa baseiam-se na ativação da PAL e na síntese de antocianinas e de ASA mas para concentrações superiores são ativados outros mecanismos antioxidantes, indicando uma possível ação de compostos fenólicos, mas sobretudo dos sistemas enzimáticos POD, APX, ASA e GSH, indicando que a via ascorbato-glutationa está ativa. Nas raízes de plantas jovens os efeitos de stresse são controlados pelo aumento da atividade enzimática da CAT mas não evitam o aparecimento de danos oxidativos. Nas

folhas novas da **planta adulta**, a GPX que tem um papel crucial na manutenção dos níveis baixos de  $H_2O_2$  e controle de danos oxidativos. Nas folhas velhas, a resposta da planta é bastante mais complexa, com produção de antocianinas, compostos fenólicos, ASA, GSH, e diversas enzimas SOD, POD, APX, GPX, indicando envolvimento da via ascorbato-glutationa. No entanto, estes mecanismos não são totalmente eficientes no controlo dos níveis de  $H_2O_2$  e da peroxidação lipídica, principalmente para níveis de Zn mais elevados. Nas raízes os mecanismos de resposta que se verificaram incidem sobretudo no POD e ASA para o controlo do  $H_2O_2$  e peroxidação lipídica, e são ativados apenas para exposição a níveis mais elevados de Zn; ainda assim, nestas condições o sistema antioxidante não é totalmente eficiente e verifica-se ocorrência de peroxidação lipídica nas raízes.

- Os materiais orgânicos podem constituir uma forma de controlar a biodisponibilidade dos elementos potencialmente tóxicos nos solos, diminuindo a acumulação destes EPTs pelas plantas. Foram aplicados 2 corretivos orgânicos naturais (pó de cortiça e estrume de cavalo seco) a solos contaminados com Cd, Cr, Pb, Ni ou Zn e verificaram-se as seguintes conclusões:

Nos solos com menores concentrações de Cd foram verificados danos oxidativos na modalidade S e nas modalidades SC e SE não existiram danos oxidativos nas plantas, devido a uma menor acumulação de Cd. Para concentrações mais elevadas de Cd nos solos foi verificado o aparecimento de danos oxidativos também nas modalidades S e SC. Em ambos os casos, a resposta antioxidante da planta é assegurada principalmente pelas antocianinas, que foram a principal forma de defesa da planta identificada nestas condições, com alguma ação concertada com a SOD e ASA.

A alface M4E acumula uma elevada quantidade de Cd sem exibir nenhum sintoma de toxicidade para nenhuma concentração de cádmio aplicada. É na modalidade SE que as plantas acumulam uma menor quantidade de Cd e, por isso, conseguem evitar o aparecimento de danos oxidativos, o que já não acontece na modalidade SC ( $12 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ) e S ( $1,5$  e  $12 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ ). A adição de corretivos orgânicos poderá fazer sentido apenas em solos contaminados com Cd, dado que a presença de cortiça e estrume provoca uma diminuição na quantidade absorvida na parte edível da planta. Dado que estes corretivos orgânicos são relativamente abundantes em Portugal a sua aplicação pode ser



promissora na remediação de solos contaminados com cádmio reduzindo a absorção de cádmio pelas plantas alimentares.

A presença destes corretivos orgânicos não teve influência no teor acumulado na planta de Cr, Pb, Ni e Zn pelo que, para os restantes EPTs estudados, poderá ser equacionada a aplicação de quantidades mais elevadas destes corretivos orgânicos. A presença de pó de cortiça e estrume de cavalo seco diminuiu a concentração apenas de Ni na fração extraível, demonstrando que a adição de estrume e cortiça poderá vir a ter influência na sua disponibilidade.

Existe **acumulação** de quantidades **significativas** de todos os EPTs em todas as **fases de desenvolvimento** da planta e para **todos os modos de produção** sem que se manifestem efeitos visíveis.

A **acumulação** dos diferentes EPTs é descrita por **diferentes modelos matemáticos** o que demonstra um **comportamento específico na absorção de cada elemento**, com comportamento semelhante na cultura com e sem solo.

O que demonstra que a alface tem **mecanismos bioquímicos eficazes de defesa** que permitem suportar estas elevadas [EPTs], parte destes mecanismos foram identificados neste trabalho.

Os resultados obtidos para as folhas das plantas do ensaio sem solo podem fornecer informações importantes para a seleção de **biomarcadores úteis** para estudos adicionais em condições de cenários reais em solo. Foram identificados **biomarcadores específicos** para cada EPT que caracterizam a resposta metabólica da planta, semelhantes na cultura com e sem solo.





# Anexos



## **Anexo A**

Nas tabelas A1 e A2 apresentam-se as concentrações de cada elemento utilizadas para fazer as curvas de calibração, os limites de quantificação e os comprimentos de onda utilizados nas técnicas de EAAC e EAAE, respetivamente.

Na técnica de EAAC foi utilizada uma chama de ar e acetileno para todos os elementos, exceto para o Cr onde foi utilizada uma chama de acetileno e protóxido de azoto. Na técnica de EAAE, utilizou-se um amostrador automático com injeção de 20 µL de amostra e, no caso do Cd e Pb, a adição de um modificador de matriz (solução a 1% de paládio).

Na tabela A3 apresentam-se as concentrações de cada elemento utilizadas para fazer as curvas de calibração, os limites de quantificação e os comprimentos de onda utilizados na técnica de ICP-OES.

**Tabela A1** – Concentrações das curvas de calibração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para cada elemento determinado por EAAC.

Elemento	Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ )					LQ	CDO (nm)
	padrão1	padrão2	padrão3	padrão4	padrão5		
Cd	0,1	0,2	0,4	0,8	1,5	0,06	228,80
Cr	0,2	0,4	1,0	2,0	4,0	0,15	357,87
Pb	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	0,5	217,00
Ni	0,2	0,4	1,0	2,0	4,0	0,12	232,00
Cu	0,4	1,0	2,0	4,0	8,0	0,25	324,75
Zn	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	0,15	213,86
Mn	1,0	2,0	4,0	8,0	12,0	0,4	279,48

Legenda: LQ – Limite de quantificação, CDO – Comprimento de onda utilizado.

**Tabela A2** – Concentrações das curvas de calibração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para cada elemento determinado por EAAC.

Elemento	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					LQ	CDO (nm)
	padrão1	padrão2	padrão3	padrão4	padrão5		
Cd	1,0	2,0	4,0	8,0	12,0	0,5	228,80
Cr	2,0	4,0	8,0	15,0	30,0	1,0	357,87
Pb	1,0	2,0	4,0	8,0	12,0	0,6	217,00
Ni	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	0,2	232,00
Cu	1,0	2,0	4,0	10,0	20,0	0,4	324,75

Legenda: LQ – Limite de quantificação, CDO – Comprimento de onda utilizado.

**Tabela A3** – Concentrações das curvas de calibração para cada elemento determinado por ICP-OES.

Elemento	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )					LQ	CDO (nm)
	padrão1	padrão2	padrão3	padrão4	padrão5		
Cd	0,02	0,1	0,5	1,0	2,0	0,005	228,802
Cr	0,02	0,1	1,0	5,0	10,0	0,015	283,563
Pb	0,02	0,1	1,0	5,0	10,0	0,010	220,553
Ni	0,02	0,1	1,0	5,0	10,0	0,015	221,647
Zn	0,1	1,0	5,0	10,0	25,0	0,020	202,548
Cu	0,02	0,1	1,0	5,0	10,0	0,010	327,396
Mn	0,02	0,1	1,0	5,0	10,0	0,010	257,610

Legenda: LQ – Limite de quantificação, CDO – Comprimento de onda utilizado



## Anexo B

Nas **Tabelas B1-B10** apresentam-se as concentrações de elementos químicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn) determinados para plantas jovens ou adultas sujeitas às diferentes condições experimentais desenvolvidas no **Capítulo V**.

**Tabela B1** – Concentração de elementos químicos Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn em folha e raiz de plantas de alface expostas durante 2 dias a 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cd.

Teor de elementos químicos ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS)			
F2			
	controlo	5 $\mu\text{M}$	15 $\mu\text{M}$
Na	764,2 $\pm$ 26,2a	767,2 $\pm$ 95,4a	810,5 $\pm$ 42,3a
K	396623,4 $\pm$ 612,3a	41049,7 $\pm$ 5585,1a	45941,4 $\pm$ 1041,4a
Ca	14299,5 $\pm$ 497,7a	15793,3 $\pm$ 846,7ab	17526,5 $\pm$ 1105,9b
Mg	3984,6 $\pm$ 328,9a	4236,3 $\pm$ 526,7a	4601,6 $\pm$ 169,9a
Mn	532,6 $\pm$ 21,9a	489,8 $\pm$ 60,3a	525,4 $\pm$ 8,4a
Fe	110,6 $\pm$ 3,3a	85,0 $\pm$ 9,4b	87,4 $\pm$ 5,3b
Cu	10,37 $\pm$ 0,41a	11,67 $\pm$ 1,47a	10,94 $\pm$ 0,02a
Zn	142,9 $\pm$ 1,5a	141,1 $\pm$ 14,1a	148,8 $\pm$ 2,5a
R2			
Na	4724,0 $\pm$ 653,4a	3510,4 $\pm$ 403,8b	2967,6 $\pm$ 331,8b
K	81841,0 $\pm$ 6015,4a	72917,4 $\pm$ 3354,9a	71554,1 $\pm$ 5620,0a
Ca	9695,8 $\pm$ 142,1a	7796,4 $\pm$ 213,1b	7674,0 $\pm$ 429,1b
Mg	2408,9 $\pm$ 112,3a	1982,7 $\pm$ 109,3b	2550,5 $\pm$ 192,9a
Mn	1201,7 $\pm$ 107,5a	1049,0 $\pm$ 34,2ab	928,8 $\pm$ 117,6b
Fe	4491,6 $\pm$ 275,6a	3933,1 $\pm$ 33,0b	4150,8 $\pm$ 114,3ab
Cu	43,1 $\pm$ 1,4a	45,1 $\pm$ 0,7a	49,7 $\pm$ 1,9b
Zn	592,6 $\pm$ 63,5a	534,5 $\pm$ 8,6a	532,5 $\pm$ 41,1a

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, em relação ao controlo.

**Tabela B2** – Concentração de elementos químicos Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn em folha e raiz de plantas de alface expostas durante 20 dias de exposição a 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cd.

Teor de elementos químicos ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS)			
	F20		
	controlo	5 $\mu\text{M}$	15 $\mu\text{M}$
Na	609,1 $\pm$ 27,3ab	493,5 $\pm$ 14,2a	822,3 $\pm$ 220,2b
K	33839,9 $\pm$ 1687,4a	30145,3 $\pm$ 1131,4a	37333,8 $\pm$ 5076,5a
Ca	13137,6 $\pm$ 449,5a	15167,7 $\pm$ 693,5b	19261,7 $\pm$ 576,0c
Mg	3701,8 $\pm$ 103,4a	3875,4 $\pm$ 199,7a	5192,4 $\pm$ 256,3b
Mn	631,1 $\pm$ 11,7a	657,3 $\pm$ 14,6a	707,9 $\pm$ 20,8b
Fe	122,4 $\pm$ 5,9a	94,1 $\pm$ 1,6b	87,0 $\pm$ 11,3b
Cu	10,5 $\pm$ 0,4a	9,5 $\pm$ 0,3a	10,8 $\pm$ 1,0a
Zn	153,0 $\pm$ 1,3a	151,7 $\pm$ 3,0a	204,4 $\pm$ 3,1b
	FV20		
	controlo	5 $\mu\text{M}$	15 $\mu\text{M}$
Na	647,5 $\pm$ 33,9a	719,3 $\pm$ 54,6a	670,9 $\pm$ 54,5a
K	44547,2 $\pm$ 2435,0a	43493,4 $\pm$ 1125,8a	38183,4 $\pm$ 2347,4b
Ca	19539,2 $\pm$ 399,8a	22226,4 $\pm$ 610,1b	24852,9 $\pm$ 810,4c
Mg	4866,9 $\pm$ 99,5a	4974,9 $\pm$ 289,9a	5250,5 $\pm$ 111,3a
Mn	1191,8 $\pm$ 21,7a	1018,5 $\pm$ 32,3b	756,0 $\pm$ 29,3c
Fe	148,3 $\pm$ 9,6a	161,1 $\pm$ 7,2a	107,4 $\pm$ 2,9b
Cu	11,5 $\pm$ 1,7a	9,1 $\pm$ 1,0ab	8,4 $\pm$ 0,1b
Zn	208,1 $\pm$ 11,6a	197,1 $\pm$ 3,8a	195,0 $\pm$ 7,8a
	R20		
	controlo	5 $\mu\text{M}$	15 $\mu\text{M}$
Na	950,4 $\pm$ 259,2a	623,6 $\pm$ 11,1ab	515,5 $\pm$ 9,2b
K	46929,1 $\pm$ 6634,2a	38524,9 $\pm$ 2672,8ab	33768,9 $\pm$ 1871,9b
Ca	11267,3 $\pm$ 1744,4a	11674,6 $\pm$ 1172,8a	13444,0 $\pm$ 482,4a
Mg	1579,7 $\pm$ 218,7a	1648,9 $\pm$ 53,6a	1695,0 $\pm$ 141,5a
Mn	1404,0 $\pm$ 188,3a	1340,5 $\pm$ 1720,1a	678,1 $\pm$ 42,5b
Fe	3781,4 $\pm$ 370,8ab	3564,4 $\pm$ 285,4a	5036,8 $\pm$ 563,7b
Cu	38,1 $\pm$ 5,8a	40,6 $\pm$ 5,5a	47,4 $\pm$ 3,7a
Zn	527,8 $\pm$ 50,7a	613,0 $\pm$ 57,4b	851,3 $\pm$ 52,1b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controlo e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, em relação ao controlo; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, em relação ao controlo.

**Tabela B3** – Concentração de elementos químicos Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn em folha e raiz de plantas de alface expostas durante 2 dias de exposição a 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cr.

Teor de elementos químicos ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS)			
<b>F2</b>			
	<b>controle</b>	<b>5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>15 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Na</b>	780,3 $\pm$ 20,5a	741,8 $\pm$ 41,5a	1045,2 $\pm$ 119,1b
<b>K</b>	33060,2 $\pm$ 1330,4a	31351,8 $\pm$ 1016,6a	41006,5 $\pm$ 5164,9b
<b>Ca</b>	16436,4 $\pm$ 779,8a	15116,2 $\pm$ 654,0a	17381,0 $\pm$ 1406,9a
<b>Mg</b>	3400,7 $\pm$ 81,9a	3282,6 $\pm$ 233,2a	3288,2 $\pm$ 212,1a
<b>Mn</b>	484,1 $\pm$ 3,8a	499,8 $\pm$ 34,2a	521,0 $\pm$ 36,5a
<b>Fe</b>	94,5 $\pm$ 1,8a	100,2 $\pm$ 2,9a	102,1 $\pm$ 9,6a
<b>Cu</b>	11,0 $\pm$ 0,6a	9,9 $\pm$ 1,2a	10,6 $\pm$ 0,8a
<b>Zn</b>	123,6 $\pm$ 2,2a	129,9 $\pm$ 5,3ab	140,7 $\pm$ 6,1b
<b>R2</b>			
	<b>controle</b>	<b>5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>15 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Na</b>	2856,9 $\pm$ 294,5a	2456,5 $\pm$ 197,7a	2388,8 $\pm$ 116,6a
<b>K</b>	65407,6 $\pm$ 803,2a	59576,9 $\pm$ 1874,3b	60338,7 $\pm$ 1852,9b
<b>Ca</b>	12502,8 $\pm$ 240,2a	11758,2 $\pm$ 498,8a	12381,9 $\pm$ 739,7a
<b>Mg</b>	2446,7 $\pm$ 99,5a	2294,7 $\pm$ 379,2a	2422,9 $\pm$ 151,2a
<b>Mn</b>	2037,8 $\pm$ 259,9a	2171,9 $\pm$ 119,0a	2082,9 $\pm$ 124,5a
<b>Fe</b>	2129,7 $\pm$ 85,2a	3009,9 $\pm$ 232,5b	3395,0 $\pm$ 137,0b
<b>Cu</b>	84,2 $\pm$ 9,7a	79,1 $\pm$ 2,8a	75,6 $\pm$ 6,4a
<b>Zn</b>	429,7 $\pm$ 24,1a	442,1 $\pm$ 10,1a	407,5 $\pm$ 7,9a

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, em relação ao controle.

**Tabela B4** – Concentração de elementos químicos Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn em folha e raiz de plantas de alface expostas durante 20 dias de exposição a 5 e 15  $\mu\text{M}$  de Cr.

Teor de elementos químicos ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS)			
F20			
	controle	5 $\mu\text{M}$	15 $\mu\text{M}$
Na	738,7 $\pm$ 48,6a	695,3 $\pm$ 36,6ab	564,4 $\pm$ 73,0b
K	44531,1 $\pm$ 2008,4a	44739,1 $\pm$ 4008,3a	37027,5 $\pm$ 3216,1a
Ca	19138,2 $\pm$ 430,9a	13976,1 $\pm$ 566,7b	15360,5 $\pm$ 433,4c
Mg	3945,1 $\pm$ 41,5a	3625,5 $\pm$ 42,4b	3431,3 $\pm$ 115,8c
Mn	1052,9 $\pm$ 38,0a	734,0 $\pm$ 14,7b	800,0 $\pm$ 23,4b
Fe	132,0 $\pm$ 10,6a	116,2 $\pm$ 3,0a	90,5 $\pm$ 4,4b
Cu	14,4 $\pm$ 0,6a	11,7 $\pm$ 0,5b	10,3 $\pm$ 0,7b
Zn	405,0 $\pm$ 8,8a	289,5 $\pm$ 2,9b	318,2 $\pm$ 5,8c
FV20			
	controle	5 $\mu\text{M}$	15 $\mu\text{M}$
Na	647,9 $\pm$ 57,3a	565,1 $\pm$ 48,3a	567,2 $\pm$ 36,0a
K	46628,0 $\pm$ 2653,3a	39787,9 $\pm$ 1523,6b	42665,4 $\pm$ 2492,8ab
Ca	24856,5 $\pm$ 1666,4a	24747,8 $\pm$ 1074,2b	21630,5 $\pm$ 748,7b
Mg	5183,7 $\pm$ 139,5a	4579,4 $\pm$ 23,0b	4011,6 $\pm$ 135,4c
Mn	1814,1 $\pm$ 9,0a	1802,7 $\pm$ 29,0a	1541,2 $\pm$ 35,8b
Fe	208,3 $\pm$ 3,9a	199,0 $\pm$ 8,8a	148,5 $\pm$ 0,6b
Cu	12,2 $\pm$ 0,7a	10,4 $\pm$ 0,1b	10,6 $\pm$ 0,1b
Zn	596,1 $\pm$ 9,1a	574,6 $\pm$ 7,5b	433,0 $\pm$ 6,3c
R20			
	controle	5 $\mu\text{M}$	15 $\mu\text{M}$
Na	1134,7 $\pm$ 140,5a	835,1 $\pm$ 171,1ab	607,9 $\pm$ 17,8b
K	52059,5 $\pm$ 3776,5a	44198,0 $\pm$ 3047,9b	38235,8 $\pm$ 1123,0b
Ca	13888,5 $\pm$ 1137,4a	11402,5 $\pm$ 1004,4ab	10542,9 $\pm$ 1080,7b
Mg	1672,7 $\pm$ 225,8a	1718,1 $\pm$ 255,1a	1858,1 $\pm$ 37,9a
Mn	2804,8 $\pm$ 154,5a	3125,5 $\pm$ 84,6b	3503,2 $\pm$ 105,6c
Fe	1791,6 $\pm$ 325,0a	1941,6 $\pm$ 522,0a	2592,7 $\pm$ 76,9a
Cu	109,8 $\pm$ 9,4a	105,4 $\pm$ 10,3a	109,1 $\pm$ 3,7a
Zn	1351,5 $\pm$ 51,2a	1340,0 $\pm$ 160,0a	1749,5 $\pm$ 68,8b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, em relação ao controle.

**Tabela B5** – Concentração de elementos químicos Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn em folha e raiz de plantas de alface expostas durante 2 dias de exposição a 125 e 150  $\mu\text{M}$  de Pb.

Teor de elementos químicos ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS)			
<b>F2</b>			
	<b>controle</b>	<b>125 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>150 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Na</b>	947,8 $\pm$ 32,3a	920,3 $\pm$ 20,0a	1088,6 $\pm$ 225,6a
<b>K</b>	46046,6 $\pm$ 2884,9ab	43564,9 $\pm$ 1193,1a	49184,8 $\pm$ 2068,2b
<b>Ca</b>	17050,1 $\pm$ 309,0a	16331,6 $\pm$ 141,4b	17549,9 $\pm$ 274,4a
<b>Mg</b>	3694,4 $\pm$ 30,1a	3405,1 $\pm$ 135,5b	3888,0 $\pm$ 105,3a
<b>Mn</b>	661,5 $\pm$ 15,4a	527,0 $\pm$ 16,7b	524,4 $\pm$ 5,3b
<b>Fe</b>	125,1 $\pm$ 3,0ab	120,4 $\pm$ 4,0a	150,3 $\pm$ 17,5b
<b>Cu</b>	12,0 $\pm$ 0,4ab	10,8 $\pm$ 0,4a	12,9 $\pm$ 0,7b
<b>Zn</b>	160,7 $\pm$ 4,3a	149,1 $\pm$ 1,2b	148,5 $\pm$ 2,7b
<b>R2</b>			
	<b>controle</b>	<b>125 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>150 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Na</b>	2651,8 $\pm$ 331,3a	2729,0 $\pm$ 478,3a	2747,1 $\pm$ 337,0a
<b>K</b>	64059,5 $\pm$ 1613,4a	60068,5 $\pm$ 2682,4a	62285,1 $\pm$ 3794,2a
<b>Ca</b>	10171,0 $\pm$ 745,1a	9266,1 $\pm$ 396,5a	9487,3 $\pm$ 178,0a
<b>Mg</b>	2214,6 $\pm$ 185,4a	2668,5 $\pm$ 185,9a	2582,1 $\pm$ 190,8a
<b>Mn</b>	2059,8 $\pm$ 267,2a	1771,6 $\pm$ 75,0a	1060,1 $\pm$ 154,7b
<b>Fe</b>	2669,2 $\pm$ 300,9a	2437,6 $\pm$ 150,7a	2507,9 $\pm$ 138,5a
<b>Cu</b>	89,5 $\pm$ 9,4a	66,1 $\pm$ 6,8b	63,1 $\pm$ 7,1b
<b>Zn</b>	445,2 $\pm$ 43,8a	397,4 $\pm$ 15,3a	325,0 $\pm$ 9,6b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, em relação ao controle.

**Tabela B6** – Concentração de elementos químicos Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn em folha e raiz de plantas de alface expostas durante 20 dias de exposição a 125 e 150 µM de Pb.

Teor de elementos químicos (mg kg <sup>-1</sup> MS)			
F20			
	controle	125 µM	150 µM
Na	1287,7±112,5a	894,9±25,2b	529,2±16,3c
K	44515,7±506,7a	46235,5±1295,8a	36826,3±117,7b
Ca	14141,0±1050,9a	18518,2±931,6b	18109,2±882,7b
Mg	3645,2±115,4a	4134,2±243,8a	3723,0±211,2a
Mn	1447,5±59,8a	837,9±39,6b	824,9±34,5b
Fe	175,1±4,7a	155,2±4,7b	103,2±8,5c
Cu	16,9±0,2a	14,6±0,1b	9,7±0,2c
Zn	490,7±20,0a	306,7±10,8b	271,6±13,7b
FV20			
	controle	125 µM	150 µM
Na	1202,3±136,5a	875,2±80,4b	630,0±16,6c
K	65752,8±2608,3a	56280,0±2846,7b	46784,7±1215,1c
Ca	27551,2±1712,3a	27866,6±2987,4a	23736,9±3276,7a
Mg	4503,3±223,6a	4982,0±257,2a	4808,5±16,2a
Mn	1632,8±97,1ab	1800,1±129,1a	1447,6±21,6b
Fe	177,8±21,6a	195,9±12,3a	121,5±3,8b
Cu	14,8±1,9ab	17,7±2,3a	11,2±1,3b
Zn	536,7±29,2a	515,1±12,1a	415,7±1,1b
R20			
	controle	125 µM	150 µM
Na	1222,1±30,5a	953,1±120,5b	556,0±30,3c
K	47452,6±2707,4a	49584,1±2734,2a	35742,7±2063,3b
Ca	7436,3±317,2a	5893,5±137,6b	4524,1±116,1c
Mg	1334,6±42,0a	1425,1±21,5a	1477,1±100,9a
Mn	2469,9±299,7a	2497,7±255,9a	2909,7±361,9a
Fe	2740,3±275,1a	1508,3±118,0b	1017,0±115,9c
Cu	119,2±13,5a	113,9±8,5a	93,2±11,6a
Zn	1509,9±242,8a	1027,8±121,9b	1040,0±160,1b

Os resultados são apresentados na forma média±desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, em relação ao controle.

**Tabela B7** – Concentração de elementos químicos Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn em folha e raiz de plantas de alface expostas durante 2 dias de exposição a 50 e 125  $\mu\text{M}$  de Ni.

Teor de elementos químicos ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS)			
	<b>F2</b>		
	<b>controle</b>	<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>125 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Na</b>	2065,6 $\pm$ 102,9a	1660,5 $\pm$ 163,9b	1621,2 $\pm$ 111,3b
<b>K</b>	56122,5 $\pm$ 6814,5a	51694,9 $\pm$ 1738,6a	61526,4 $\pm$ 1332,4a
<b>Ca</b>	18288,2 $\pm$ 118,3a	17948,7 $\pm$ 13,8a	18428,5 $\pm$ 1038,5a
<b>Mg</b>	4192,4 $\pm$ 197,4a	4159,7 $\pm$ 127,0a	4241,6 $\pm$ 143,0a
<b>Mn</b>	870,6 $\pm$ 18,4a	804,4 $\pm$ 64,5a	832,0 $\pm$ 26,7a
<b>Fe</b>	287,9 $\pm$ 28,9a	241,3 $\pm$ 7,7a	250,9 $\pm$ 12,9a
<b>Cu</b>	15,5 $\pm$ 0,9a	13,9 $\pm$ 0,9a	13,9 $\pm$ 0,5a
<b>Zn</b>	205,1 $\pm$ 7,9a	200,5 $\pm$ 10,3a	209,9 $\pm$ 5,3a
	<b>R2</b>		
	<b>controle</b>	<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>125 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Na</b>	4174,8 $\pm$ 222,5a	3983,9 $\pm$ 578,3a	4185,2 $\pm$ 29,8a
<b>K</b>	78932,3 $\pm$ 1692,8a	71983,8 $\pm$ 4466,1a	80807,0 $\pm$ 6134,2a
<b>Ca</b>	8822,0 $\pm$ 21,4a	7651,5 $\pm$ 687,9a	8648,9 $\pm$ 671,1a
<b>Mg</b>	3257,5 $\pm$ 327,0a	2918,1 $\pm$ 320,2a	3625,6 $\pm$ 507,1a
<b>Mn</b>	2174,9 $\pm$ 37,1ab	2057,7 $\pm$ 173,2a	2398,3 $\pm$ 145,1b
<b>Fe</b>	4617,7 $\pm$ 252,0a	4379,8 $\pm$ 523,4a	5770,9 $\pm$ 413,2b
<b>Cu</b>	67,4 $\pm$ 4,0a	56,9 $\pm$ 4,1ab	55,1 $\pm$ 5,2b
<b>Zn</b>	627,1 $\pm$ 17,3a	626,5 $\pm$ 36,0a	653,3 $\pm$ 47,4a

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, em relação ao controle.



**Tabela B8** – Concentração de elementos químicos Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn em folha e raiz de plantas de alface expostas durante 20 dias de exposição a 50 e 125 µM de Ni.

Teor de elementos químicos (mg kg <sup>-1</sup> MS)			
F20			
	controle	50 µM	125 µM
Na	624,9±36,4a	603,4±29,1a	624,2±27,2a
K	34856,4±2167,5a	33208,0±1768,6a	33993,1±234,2a
Ca	11978,5±765,2a	13245,4±58,4b	16493,3±296,2c
Mg	3244,5±178,2a	2918,3±247,8a	3052,6±63,9a
Mn	428,5±5,0a	554,3±26,6b	377,6±14,5c
Fe	107,1±2,6a	126,1±2,8b	88,0±11,9c
Cu	10,6±0,6a	9,9±0,2a	7,1±1,1b
Zn	119,8±1,8a	167,5±0,9b	132,4±9,2a
FV20			
	controle	50 µM	125 µM
Na	864,0±79,5ab	680,3±112,9a	998,2±93,5b
K	43214,7±3035,9ab	40317,7±2410,4a	47834,6±2466,6b
Ca	20958,5±1911,4a	21072,4±1667,3a	23129,4±2165,6a
Mg	4506,4±494,5a	3902,8±192,0a	4339,1±275,2a
Mn	856,3±99,2a	1010,3±75,1a	756,5±165,2a
Fe	171,0±10,9a	148,5±6,1b	168,4±2,6a
Cu	12,3±0,3a	9,9±0,8b	11,1±0,5ab
Zn	173,4±6,5a	233,9±6,6b	197,5±16,6a
R20			
	controle	50 µM	125 µM
Na	1713,4±164,4a	1399,7±246,5b	2715,0±164,3b
K	66477,4±8355,1a	57198,0±4226,4a	62184,9±5428,4a
Ca	8702,2±647,7a	9871,1±885,0a	8556,8±888,2a
Mg	1584,4±226,3a	1601,1±349,2a	1701,3±48,1a
Mn	1640,2±114,7ab	1667,8±219,6a	1273,5±70,9b
Fe	3791,1±367,3ab	3365,5±475,2a	4541,1±364,9b
Cu	29,1±5,3ab	26,1±4,3a	39,7±3,9b
Zn	512,1±34,3a	569,2±61,8ab	673,9±33,0b

Os resultados são apresentados na forma média±desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) (n=3); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, em relação ao controle.

**Tabela B9** – Concentração de elementos químicos Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn em folha e raiz de plantas de alface expostas durante 2 dias de exposição a 50 e 150 µM de Zn.

Teor de elementos químicos (mg kg <sup>-1</sup> MS)			
<b>F2</b>			
	<b>controle</b>	<b>50 µM</b>	<b>150 µM</b>
<b>Na</b>	1423,5±158,7a	1822,8±42,2b	1723,1±156,1ab
<b>K</b>	52026,5±4102,6a	57968,8±323,4a	57074,7±2235,0a
<b>Ca</b>	16634,3±1207,1a	18463,9±86,1ab	18613,4±536,4b
<b>Mg</b>	4045,8±255,5a	3859,9±222,2a	4320,4±73,2a
<b>Mn</b>	613,6±37,6a	544,7±15,0a	746,3±32,1b
<b>Fe</b>	181,6±40,3a	211,4±4,0a	191,6±14,9a
<b>Cu</b>	12,4±0,7a	15,0±0,7b	14,7±0,8b
<b>R2</b>			
	<b>controle</b>	<b>50 µM</b>	<b>150 µM</b>
<b>Na</b>	4824,6±423,7a	4495,2±264,0a	4133,6±108,4a
<b>K</b>	74695,4±5955,2a	67896,9±525,2a	66555,8±2811,8a
<b>Ca</b>	12359,7±848,9a	14122,2±956,0a	12428,4±897,3a
<b>Mg</b>	3224,5±494,0a	3795,5±314,5a	3452,6±589,3a
<b>Mn</b>	1619,1±145,8a	1801,7±110,6a	1613,5±85,7a
<b>Fe</b>	3727,3±430,8a	3989,1±141,1a	4064,9±187,5a
<b>Cu</b>	53,0±5,4a	61,5±6,8a	61,6±3,7a

Os resultados são apresentados na forma média±desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) (n=3); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, em relação ao controle.

**Tabela B10** – Concentração de elementos químicos Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn em folha e raiz de plantas de alface expostas durante 20 dias de exposição a 50 e 150  $\mu\text{M}$  de Zn.

Teor de elementos químicos ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS)			
<b>F20</b>			
	<b>controle</b>	<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>150 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Na</b>	556,6 $\pm$ 53,2a	489,7 $\pm$ 6,1a	1248,4 $\pm$ 113,6b
<b>K</b>	36418,2 $\pm$ 2672,3a	33103,1 $\pm$ 1844,0a	41366,7 $\pm$ 5296,2a
<b>Ca</b>	12725,6 $\pm$ 1458,1a	11917,4 $\pm$ 927,3a	13674,3 $\pm$ 1180,9a
<b>Mg</b>	3685,3 $\pm$ 133,8a	3678,0 $\pm$ 71,1a	4033,3 $\pm$ 305,7a
<b>Mn</b>	488,9 $\pm$ 15,2a	663,0 $\pm$ 44,3b	977,6 $\pm$ 86,8c
<b>Fe</b>	115,0 $\pm$ 11,9a	120,6 $\pm$ 3,0a	438,7 $\pm$ 28,3b
<b>Cu</b>	12,2 $\pm$ 1,2a	13,0 $\pm$ 0,2a	15,6 $\pm$ 1,0b
<b>FV20</b>			
	<b>controle</b>	<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>150 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Na</b>	1231,1 $\pm$ 227,3a	970,0 $\pm$ 63,3a	1317,5 $\pm$ 54,2a
<b>K</b>	59656,9 $\pm$ 4358,3a	50049,3 $\pm$ 530,4b	42584,4 $\pm$ 3354,6b
<b>Ca</b>	21090,3 $\pm$ 759,5a	19337,5 $\pm$ 1211,8b	12350,1 $\pm$ 395,8b
<b>Mg</b>	5014,9 $\pm$ 143,6a	3639,5 $\pm$ 193,1b	2617,9 $\pm$ 91,0c
<b>Mn</b>	814,2 $\pm$ 61,1a	1344,8 $\pm$ 200,5b	1224,9 $\pm$ 91,3b
<b>Fe</b>	217,6 $\pm$ 48,8a	219,0 $\pm$ 20,6a	418,3 $\pm$ 28,0b
<b>Cu</b>	15,7 $\pm$ 1,7a	10,8 $\pm$ 0,3b	9,9 $\pm$ 0,4b
<b>R20</b>			
	<b>controle</b>	<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>150 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Na</b>	1598,9 $\pm$ 81,1a	1747,3 $\pm$ 184,1a	1745,2 $\pm$ 226,5a
<b>K</b>	64840,2 $\pm$ 3716,8a	54822,7 $\pm$ 3838,2b	52048,9 $\pm$ 1439,6b
<b>Ca</b>	10534,2 $\pm$ 664,9a	9429,7 $\pm$ 461,5a	12141,2 $\pm$ 218,0b
<b>Mg</b>	1409,4 $\pm$ 82,9a	1406,0 $\pm$ 64,9a	1342,1 $\pm$ 248,0a
<b>Mn</b>	1307,6 $\pm$ 217,2a	962,8 $\pm$ 154,5a	889,0 $\pm$ 120,3a
<b>Fe</b>	2356,2 $\pm$ 297,0a	2395,0 $\pm$ 336,8a	5605,3 $\pm$ 470,9b
<b>Cu</b>	30,0 $\pm$ 4,8a	32,9 $\pm$ 7,1a	92,5 $\pm$ 8,2b

Os resultados são apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão; as letras minúsculas indicam se existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada modalidade (controle e plantas contaminadas) ( $n=3$ ); o **sombreado a verde** indica um aumento significativo, em relação ao controle; e o **sombreado a laranja** indica uma diminuição significativa, em relação ao controle.